

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ESTUDOS QUÍMICOS FARMACOLÓGICOS E ALELOPÁTICOS DAS ESPÉCIES

*Drimys angustifolia e Drimys brasiliensis (WINTERACEAE)*

ANGELA MALHEIROS

FLORIANÓPOLIS

ABRIL/2001

ANGELA MALHEIROS

*ESTUDOS QUÍMICOS FARMACOLÓGICOS E ALELOPÁTICOS DAS ESPÉCIES*

*Drimys angustifolia e Drimys brasiliensis (WINTERACEAE)*

Tese apresentada ao curso de pós-graduação em  
Química da Universidade Federal de Santa  
Catarina, para a obtenção do grau de Doutor em  
Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Rosendo A. Yunes

Co-Orientador: Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho

Co-Orientador: Prof. Dr. José Carlos Gesser

Florianópolis  
Universidade Federal de Santa Catarina

2001

*Não está na natureza das coisas que o homem realize um descobrimento súbito e inesperado; a ciência avança passo a passo e cada homem depende do trabalho de seus antecessores.*

Ernest Rutherford

*Aos meus pais e grandes mestres, José e Amélia, e a minha grande família, sempre presente nesta caminhada.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus criador de toda beleza.

Ao Prof. Dr. Rosendo A. Yunes pela orientação, confiança, carinho, incentivo e apoio oferecidos durante todas as etapas deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho pela co-orientação, amizade, dedicação e apoio durante este trabalho.

Ao Prof. Dr. Franco Delle Monache, pelo grande auxílio prestado na obtenção de espectros e elucidação estrutural, pelo carinho e dedicação durante o meu estágio em Roma e por todos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. José Carlos Gesser por aceitar a coorientação deste trabalho.

Ao prof. Dr. João Batista Calixto, pelos ensaios farmacológicos.

A Prof<sup>a</sup>. Dra. Susana Zachino, pelos ensaios antifúngicos.

A Prof<sup>a</sup>. Dra. Maike H. de Queiroz, por ceder o Laboratório Sementes Florestais, para realizarmos os ensaios alelopáticos e pelas discussões.

Aos Prof. Dr. Ademir dos Reis e Prof<sup>a</sup> Dra. Leila da Graça Amaral, pela classificação das plantas.

Aos Prof. Dr. Miguel Caro e Luiz Madureira pelas análises e discussões.

A grande amiga Neide, por toda a amizade, convivência, apoio, e grande colaboração na parte computacional deste trabalho.

A Clarisse, por toda a colaboração na parte experimental deste trabalho, também pela amizade e apoio.

A Marize, pela amizade e colaboração na parte de alelopatia.

Aos amigos, Elisane, Fábio, Ivania, Alessandra, Miriam, Lucia, Christiane, Adolfo, Sandra, Josiel, Claudia e Vanessa pelo companheirismo, apoio e por todas as festas.

Aos companheiros de laboratório, Guedes, Niero, Tiago, Paulo, Jacir, Fabiana, Tânia, Christiane, Paula, Valquiria, Louziane, Lourdes, Rosi, Dione, Julieta, Renata, Berenice, Rosane, Rosanea e Renata pela colaboração, amizade e incentivo.

A Márcia e a Mariza, por todo auxílio durante estes anos.

As amigas Flavia, Ieda, Ivonete e Arleide e demais professores do Depto de Química da FURB pelo companheirismo.

Aos alunos do Lab. De Farmacologia da UFSC, Adair, Eunice, Cristiano, Juliano, Gilboé e Marien pela colaboração na realização dos testes de atividade farmacológica.

A Graça e Jadir, por todo auxílio e amizade.

Aos funcionários da Biblioteca e central de análises, pelos serviços prestados.

Aos Professores da Pós-graduação em Química da UFSC.

Ao departamento de Química da UFSC,

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e/ou meu crescimento pessoal.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>01</b>
1.1. ASPECTOS GERAIS.....	01
1.2. PRODUTOS NATURAIS (METABÓLITOS SECUNDÁRIOS).....	02
1.3. INTERAÇÃO ENTRE QUÍMICA DE PRODUTOS NATURAIS E FARMACOLOGIA.....	03
1.4. INTERAÇÃO ENTRE QUÍMICA DE PRODUTOS NATURAIS E ECOLOGIA.....	06
1.5. PROCEDIMENTOS GERAIS PARA A OBTENÇÃO DE PRINCÍPIOS ATIVOS DE PLANTAS .....	08
1.5.1. Seleção da planta e preparação dos extratos .....	08
1.5.2. Fracionamento e isolamento.....	09
1.5.3. Determinação estrutural.....	11
1.5.4. Modificação estrutural e correlação entre estrutura química e atividade biológica.....	12
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA DO GÊNERO <i>Drimys</i>.....</b>	<b>13</b>
2.1. POSIÇÃO TAXONÔMICA DE <i>Drimys</i> .....	13
2.2. ASPECTOS BOTÂNICOS DO GÊNERO <i>Drimys</i> .....	13
2.3. ASPECTOS QUÍMICOS DO GÊNERO <i>Drimys</i> .....	16
2.3.1. Constituintes químicos isolados do gênero <i>Drimys</i> .....	16
2.3.2. Sesquiterpenos drimanos: Aspectos gerais.....	22
2.3.2.1. Poligodial.....	24
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
3.1. OBJETIVOS GERAIS .....	27
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	27
<b>4. PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>28</b>
4.1. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.2. MATERIAL VEGETAL <i>Drimys angustifolia</i> .....	29
4.2.1. Coleta.....	29
4.2.2. Obtenção do extrato.....	29
4.2.2.1. Isolamento e purificação dos constituintes da fração CHCl <sub>3</sub> .....	29

4.3.	MATERIAL VEGETAL <i>Drimys brasiliensis</i> .....	33
4.3.1.	Coleta.....	33
4.3.2.	Obtenção do extrato das cascas .....	34
4.3.2.1.	Isolamento e purificação dos constituintes do extrato DB CHCl <sub>3</sub> .....	34
4.3.3.	Obtenção dos extratos dos caules .....	36
4.3.3.1.	Isolamento e purificação dos constituintes do extrato DBC CHCl <sub>3</sub> ....	36
4.3.4.	Obtenção dos extratos das folhas .....	37
4.3.4.1.	Isolamento e purificação dos constituintes do extrato DBF CHCl <sub>3</sub> ....	37
4.4.	MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS NO POLIGODIAL .....	39
4.4.1.	Reação de redução dos grupos aldeídos do poligodial.....	39
4.4.2.	Obtenção da oxima do poligodial.....	39
4.4.3.	Obtenção do derivado semicarbazona do poligodial.....	40
4.4.4.	Obtenção do derivado 2,4-dinitrofenil-hidrazona do poligodial .....	40
4.4.5.	Reação do poligodial com p-aminoacetofenona.....	40
4.4.6.	Reação do poligodial com metilamina .....	41
4.4.7.	Reação do poligodial com etilamina .....	41
4.4.8.	Reação de oxidação dos grupos aldeídos do poligodial .....	41
4.4.9.	Reação de bromação do poligodial.....	42
4.4.10.	Reação de epoxidação da dupla ligação do poligodial.....	42
4.4.11.	Transformação de poligodial a isopoligodial .....	43
4.5.	ANÁLISE POR CG DOS EXTRATOS DB CHCl <sub>3</sub> DAS CASCAS, CAULES E FOLHAS DA <i>Drimys brasiliensis</i> .....	43
4.6.	ATIVIDADE BIOLÓGICA .....	44
4.6.1.	Atividade Alelopática.....	44
4.6.1.1.	Bioensaios de germinação e crescimento .....	45
4.6.2.	Atividade Antifúngica .....	45
4.6.3.	Atividade Antinociceptiva ou Analgésica .....	46
4.6.3.1.	Modelo das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0,6% em camundongos.....	46
4.6.3.2.	Modelo da dor induzida pela formalina.....	47
4.6.4.	Análise estatística .....	48
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49



5.1.	EXTRAÇÃO .....	49
5.2.	IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS ISOLADOS DAS CASCAS DE <i>D. angustifolia</i> .....	50
5.2.1.	Composto DW-1 .....	51
5.2.2.	Composto DW-1.1 .....	57
5.2.3.	Composto DW-3 .....	61
5.2.4.	Composto DW-8 .....	64
5.2.5.	Composto DW-8.1 .....	70
5.2.6.	Composto DW-5 .....	74
5.2.7.	Composto DW-2 .....	80
5.2.8.	Mistura dos compostos DW-7 .....	92
5.3.	IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS ISOLADOS DE <i>Drimys brasiliensis</i> .....	104
5.3.1.	Composto DB-9 .....	105
5.3.2.	Composto DBF-10 .....	110
5.4.	MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS NO POLIGODIAL .....	115
5.4.1.	Reação de redução dos grupos aldeídos do poligodial .....	115
5.4.2.	Obtenção da oxima do poligodial .....	119
5.4.3.	Obtenção do derivado semicarbazona do poligodial .....	123
5.4.4.	Obtenção do derivado 2,4-dinitrofenilidrazona do poligodial .....	124
5.4.5.	Reação do poligodial com p-aminoacetofenona .....	127
5.4.6.	Reação do poligodial com metilamina e etilamina .....	129
5.4.7.	Reação de oxidação dos grupos aldeídos do poligodial .....	129
5.4.8.	Reação de bromação do poligodial .....	129
5.4.9.	Reação de epoxidação da dupla ligação do poligodial .....	132
5.4.10.	Reação do poligodial com etanol e benzeno .....	132
5.5.	PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS EXTRATOS CHCl <sub>3</sub> DAS CASCAS, CAULES E FOLHAS DE <i>D. brasiliensis</i> .....	135
5.5.1.	Perfil cromatográfico de frações do extrato CHCl <sub>3</sub> das cascas de <i>D. brasiliensis</i> .....	137
5.5.2.	Perfil cromatográfico de frações do extrato CHCl <sub>3</sub> das folhas de <i>D. brasiliensis</i> .....	148
5.6.	ATIVIDADE BIOLÓGICA .....	154

5.6.1. Atividade Alelopática.....	154
5.6.1.1. Semente alva <i>Lactuca sativa</i> .....	154
5.6.1.2. Semente alva <i>Clusia parviflora</i> .....	163
5.6.2. Atividade antifúngica .....	166
5.6.3. Atividade antinociceptiva ou analgésica .....	168
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>173</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>176</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Metabólitos secundários isolados da <i>Drimys angustifolia</i> .....	16
Tabela 2 - Metabólitos secundários isolados da <i>Drimys brasiliensis</i> .....	18
Tabela 3 - Metabólitos secundários isolados da <i>Drimys granadensis</i> .....	18
Tabela 4 - Valores de deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ para DW-1 e dados da literatura para poligodial.....	55
Tabela 5 - Valores de deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ para poligodial e $\delta$ obtidos para DW-1.1 .....	59
Tabela 6 - Valores de deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ para DW-3 e obtidos para mukaadial .....	63
Tabela 7 - Valores de deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ para DW-8 e dados de RMN $^1\text{H}$ para 1- $\beta$ -(p-metoxicinamil)-poligodial .....	65
Tabela 8 - Valores de deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ obtidos para DW-8.1 e dados de DW-8.....	71
Tabela 9 - Valores de deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ para DW-5 e dados da literatura para (1- $\beta$ -(p-cumaroiloxil) poligodial ) .....	77
Tabela 10 - Valores de deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ para DW-2 em acetona- $\text{d}_6$ e $\text{CDCl}_3$ .....	84
Tabela 11 - Conectividades a longa distância para DW-2 .....	87
Tabela 12 - Valores de deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ para DW-7 e DW-7Ac.....	98
Tabela 13 - Conectividades a longa distância para DW-7 (49a) e DW-7Ac (50a) .....	99
Tabela 14 - Valores de deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ para DB-9 e dados da literatura para fuegina .....	107
Tabela 15 - Valores de deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ para DBF-10 e dados da literatura para $\alpha$ e $\beta$ cubebina.....	112
Tabela 16 - Valores de deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ para DR-3 e dados da literatura para drimendiol .....	117
Tabela 17 - Valores de deslocamentos químicos de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de DR-2.....	120

Tabela 18 - Valores de deslocamento químicos de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ obtidos para DR-4 .....	126
Tabela 19 - Efeito dos extratos DB $\text{CHCl}_3$ e MeOH das cascas de <i>D.brasiliensis</i> sobre o crescimento da radícula e hipocótilo de <i>Lactuca sativa</i> .....	156
Tabela 20 - Efeito dos extratos DBC $\text{CHCl}_3$ e MeOH dos caules de <i>D.brasiliensis</i> sobre o crescimento da radícula e hipocótilo de <i>Lactuca sativa</i> .....	157
Tabela 21 - Efeito dos extratos DBF $\text{CHCl}_3$ e MeOH das folhas de <i>D.brasiliensis</i> sobre o crescimento da radícula e hipocótilo de <i>Lactuca sativa</i> .....	159
Tabela 22 - Efeito dos compostos poligodial, drimanial, mistura de poligodial e drimanial e 1- $\beta$ -(p-cumaroil)-polygodial, isolados das cascas de <i>Drimys brasiliensis</i> sobre o crescimento de <i>lactuca sativa</i> .....	161
Tabela 23 - Efeito dos extratos DB $\text{CHCl}_3$ e MeOH e dos compostos poligodial e drimanial sobre o crescimento da radícula e hipocótilo de <i>Clusia parviflora</i> .....	165
Tabela 24 - Atividade antigúngica apresentada pelos extratos das cascas, caules e folhas de <i>D. brasiliensis</i> (CIM $\mu\text{g/mL}$ ) .....	167
Tabela 25 - Atividade antifúngica apresentada pelos compostos isolados das cascas de <i>D. angustifolia</i> e <i>D. brasiliensis</i> (CIM $\mu\text{g/mL}$ ) .....	168
Tabela 26 - Atividade antinociceptiva de poligodial ( <b>8</b> ), drimanial ( <b>47</b> ) e 1- $\beta$ -(p-metoxicinamil)-poligodial ( <b>10</b> ) analisadas pelo modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos .....	169
Tabela 27 - Comparação do efeito antinociceptivo de drimanial ( <b>47</b> ) com medicamentos antiinflamatórios não esteroidais e analgésicos.....	170

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Procedimento geral de partição e provável separação dos principais metabólitos secundários presentes em plantas .....	10
Figura 2 – <i>Drimys angustifolia</i> .....	15
Figura 3 – Estruturas dos sesquiterpenos drimanos isolados no gênero <i>Drimys</i> .....	19
Figura 4 – Estruturas dos flavonóides isolados no gênero <i>Drimys</i> .....	21
Figura 5 – Outros compostos isolados no gênero <i>Drimys</i> .....	22
Figura 6 – Esqueleto básico drimano .....	23
Figura 7 - Rota biosintética de drimanos.....	24
Figura 8 – Fracionamento do extrato CHCl <sub>3</sub> das cascas de <i>Drimys angustifolia</i> .....	32
Figura 9 – Fracionamento de extrato CHCl <sub>3</sub> das cascas de <i>D. brasiliensis</i> .....	35
Figura 10 - Fracionamento do extrato DBF CHCl <sub>3</sub> caules de <i>D. brasiliensis</i> .....	37
Figura 11 – Fracionamento do extrato DBF CHCl <sub>3</sub> das folhas de <i>D. brasiliensis</i> .....	38
Figura 12- Esquema de um ensaio alelopático .....	45
Figura 13 – Determinação da CIM pelo método de diluição .....	46
Figura 14 - Espectro no IV (pastilha de KBr) de DW-1.....	52
Figura 15 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (200 MHz, CDCl <sub>3</sub> /TMS) do DW-1 .....	53
Figura 16 – Espectro de RMN <sup>13</sup> C (50 MHz, CDCl <sub>3</sub> /TMS) do DW-1.....	54
Figura 17 – Espectro de DEPT (50 MHz, CDCl <sub>3</sub> /TMS) do DW-1 .....	54
Figura 18 - Espectro de massas (70 eV) do DW-1 .....	56
Figura 19 – Fragmentação do DW-1 .....	56
Figura 20 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (200 MHz, CDCl <sub>3</sub> /TMS) do DW-1.1 .....	58
Figura 21 – espectro de RMN <sup>13</sup> C (50 MHz, CDCl <sub>3</sub> /TMS) do DW-1.1 .....	58
Figura 22 – Espectro de COSY (200 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do DW-1.1.....	60
Figura 23 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> /MeOH) do DW-3 .....	62
Figura 24 - Espectro de RMN <sup>13</sup> C (75,5 MHz, CDCl <sub>3</sub> /MeOH) do DW-3 .....	62
Figura 25 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (200 MHz, CDCl <sub>3</sub> /TMS) do DW-8 .....	66
Figura 26 – Espectro de RMN <sup>13</sup> C (50 MHz, CDCl <sub>3</sub> /TMS) do DW-8.....	66
Figura 27 – Espectro de DEPT (50 MHz, CDCl <sub>3</sub> /TMS) do DW-8 .....	67
Figura 28 – Espectro de COSY (200 MHz, CDCl <sub>3</sub> /TMS) de DW-8 .....	67
Figura 29 – Espectro de massas (70 eV) do DW-8 .....	68

Figura 30 – Fragmentação do DW-8 .....	69
Figura 31 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ) do DW-8.1 .....	72
Figura 32 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (50 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ) do DW-8.1 .....	72
Figura 33 – Espectro de DEPT (50 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ) do DW-8.1 .....	73
Figura 34 – Espectro de NOESY de (200 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ) DW-8.1 .....	73
Figura 35 – Espectro no IV (pastilha de KBr) de DW-5 .....	74
Figura 36 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do DW-5 .....	75
Figura 37 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ / APT 80-210 ppm (75,5 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do DW-5..	76
Figura 38 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ / APT 0-80 ppm (75,5 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do DW-5 .....	76
Figura 39 – Espectro de massas (70 Ev) de DW-5 .....	78
Figura 40 – Fragmentação de DW-5 .....	79
Figura 41 – Espectro no IV (pastilha de KBr) do DWC-2 .....	81
Figura 42 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ) do DW-2 .....	82
Figura 43 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (50 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ) do DW-2 .....	83
Figura 44 – Espectro de DEPT (50 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ) de DW-2 .....	83
Figura 45 – Espectro de HETCOR (200 MHz/ $\text{CDCl}_3$ ) de DW-2 .....	85
Figura 46 a – Espectro de HETCOR LR (300 MHz / acetona- $\text{d}_6$ ) DW-2 20 a 50 ppm .....	85
Figura 46 b – Espectro de HETCOR LR (300 MHz / acetona- $\text{d}_6$ ) DW-2 35 a 80 ppm e 110 a 200 ppm .....	86
Figura 47 a – Espectro de INEPT seletivo de DW-2 IRR 9,78, 9,36, 7,04 ppm .....	87
Figura 47 b – Espectro de INEPT seletivo de DW-2 IRR 5,35, 2,93, 1,23, 1,17, 1,06 ppm .....	88
Figura 48 a – Espectro de NOE diferencial de DW-2 IRR 5,35, 3,80, 3,23 ppm .....	89
Figura 48 b – Espectro de NOE diferencial de DW-2 IRR 3,80, 9,78, 1,17, 1,23 ppm .	90
Figura 49 – Espectro de massas (70 eV) do DW-2 .....	91
Figura 50 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DW-7 .....	93
Figura 51 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (75,5 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DW-7 .....	94
Figura 52 – Espectro de COSY (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DW-7 .....	95
Figura 53 a – Espectro de INEPT seletivo de DW-7 IRR 1,26, 2,12, 3,12 ppm .....	95
Figura 53 – Espectro de INEPT seletivo de DW-7 IRR 5,34, 0,72, 1,04, 0,94, 0,90, 4,96 ppm .....	96
Figura 54 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DW-7Ac .....	100

Figura 55 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (75,5 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DW-7Ac .....	101
Figura 56 – Espectro de HETCOR (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DW-7Ac .....	102
Figura 57 – Espectro de INEPT seletivo de DW-7Ac.....	103
Figura 58 - Espectro no IV (pastilha de KBr) de DB-9.....	106
Figura 59 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DB-9 .....	107
Figura 60 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (75,5 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DB-9 .....	108
Figura 61 - Espectro de HETCOR de DB-9 .....	109
Figura 62 - Espectro de HETCOR LR de DB-9.....	109
Figura 63 – Espectro no IV (pastilha de KBr) do DBF-10.....	110
Figura 64 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DBF-10 .....	111
Figura 65 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (75,5 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DBF-10.....	113
Figura 66 – Espectro de DEPT (75,5 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DBF-10 .....	113
Figura 67 – Espectro de massas (70 eV) do DBF-10 .....	114
Figura 68 – Fragmentação do DBF-10 .....	114
Figura 69 – Espectro no IV (pastilha de KBr) de DR-1 .....	116
Figura 70 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DR-1 .....	118
Figura 71 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DR-1 .....	118
Figura 72 – Espectro no IV (pastilha de KBr) do <b>(51)</b> .....	119
Figura 73 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DR-2.....	121
Figura 74 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DR-2.....	121
Figura 75 – Espectro de DEPT ( 50 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DR-2.....	122
Figura 76 – Espectro de massas (70 eV) de DR-2.....	122
Figura 77 – Espectro no IV (pastilha de KBr) DR-3.....	123
Figura 78 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ (acetona- $\text{d}_6$ , 300 MHz) de DR-4 .....	125
Figura 79 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (75,5 MHz, acetona- $\text{d}_6$ ) de DR-4.....	125
Figura 80 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) obtidos para DR-5 .....	128
Figura 81 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DR-5 .....	128
Figura 82 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DR-8 .....	130
Figura 83 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DR-8 .....	131
Figura 84 – Espectro de DEPT (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DR-8.....	131
Figura 85 – Cromatograma do poligodial em etanol sob refluxo (a) início da reação (b) após uma hora de reação .....	133

Figura 86 - Cromatograma do poligodial em benzeno sob refluxo (a) início da reação (b) após uma hora de reação .....	134
Figura 87 - Cromatograma das diferentes partes do extrato $\text{CHCl}_3$ de <i>D. brasiliensis</i> (A cascas, B caules, C folhas, 1 poligodial (8)) .....	136
Figura 88 – Fragmentações drimanos.....	137
Figura 89 – Cromatograma da fração DB $\text{CHCl}_3$ 1-15 .....	138
Figura 90 - Cromatograma da fração DB $\text{CHCl}_3$ 16-18 .....	139
Figura 91 - Cromatograma da fração DB $\text{CHCl}_3$ 16-18 a) Tr 15,60 min, b) Tr 15,75 min, c) Tr 17,03 min.....	140
Figura 92 - Espectros de massas obtidos da fração DB $\text{CHCl}_3$ 16-18 a) Tr 17,83 min, b) 18,66 min, c) Tr 19,76 min.....	141
Figura 93 - Espectros de massas obtidos da fração DB $\text{CHCl}_3$ 16-18 a) Tr 20,63 min, b) 21,50 min, c) Tr 23,03 min.....	142
Figura 94 - Cromatograma da fração DB $\text{CHCl}_3$ 19-25 .....	143
Figura 95 - Espectros de massas obtidos da fração DB $\text{CHCl}_3$ 19-25 a) Tr 14,56 min b) 15,16 min, c) 15,53 min .....	144
Figura 96 - Espectros de massas obtidos da fração DB $\text{CHCl}_3$ 19-25 a) Tr 17,10 min b) 17,83 min, c) 19,46 min .....	145
Figura 97 - Espectros de massas obtidos da fração DB $\text{CHCl}_3$ 19-25 a) Tr 21,76 min b) 21,93 min, c) 22,00 min .....	146
Figura 98 - Espectros de massas obtidos da fração DB $\text{CHCl}_3$ 19-25 a) Tr 23,36 min b) 24,13 min.....	147
Figura 99 - Cromatograma da fração DBF $\text{CHCl}_3$ 1-12.....	148
Figura 100 - Espectros de massas obtidos da fração DBF $\text{CHCl}_3$ 1-12 tr 24,90 min.....	149
Figura 101 – Espectros de massas obtidos da fração DBF $\text{CHCl}_3$ 1-12 tr 34,03 min ....	149
Figura 102 – Espectro no IV (pastilha de KBr) do composto purificado da fração DBF-1-12 .....	150
Figura 103 – Cromatograma da fração DBF $\text{CHCl}_3$ 13-14 .....	151
Figura 104 – Espectro de massas da fração DBF $\text{CHCl}_3$ 13-14 .....	151
Figura 105 – Espectro no IV (pastilha de KBr) da fração DBF $\text{CHCl}_3$ 13-14 .....	152
Figura 106 – Espectro no IV (pastilha de KBr) da fração DBF $\text{CHCl}_3$ 15-18 .....	153
Figura 107 - Espectro no IV (pastilha de KBr) da fração DBF $\text{CHCl}_3$ 19-33.....	153



Figura 108 - Ação do extrato DB CHCl <sub>3</sub> (A) e MeOH (B) das cascas de <i>Drimys brasiliensis</i> sobre o crescimento de <i>lactuca sativa</i> .....	155
Figura 109 - Ação dos extratos DBC CHCl <sub>3</sub> (A) e MeOH (B) dos caules de <i>Drimys brasiliensis</i> sobre o crescimento de <i>lactuca sativa</i> .....	157
Figura 110 - Ação dos extratos DBF CHCl <sub>3</sub> (A) e MeOH (B) das folhas de <i>Drimys brasiliensis</i> sobre o crescimento de <i>lactuca sativa</i> .....	158
Figura 111 - Ação dos compostos poligodial (A), drimanial (B), mistura de poligodial e drimanial (C) e 1-β-(p-cumaroil)-polygodial (D), isolados das cascas de <i>Drimys brasiliensis</i> sobre o crescimento de <i>lactuca sativa</i> .....	160
Figura 112 - Ação dos extratos BD CHCl <sub>3</sub> (A) e MeOH (B) e dos compostos poligodial (C), drimanial (D) sobre o crescimento de <i>Clusia parviflora</i> .....	164
Figura 113 – Efeito do drimanial sobre a dor induzida pela formalina administrado por via i.p. ....	170
Figura 114 – Efeito do isopoligodial, drimendiol e drimenol sobre a dor induzida pela formalina administrado por via i.p (10 mg/Kg) .....	171

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

Acetona-d <sub>6</sub>	acetona deuterada
AcOEt	acetato de etila
APT	Attached Proton Test
c.c	cromatografia em coluna
c.c.d.	cromatografia em camada delgada
CDCl <sub>3</sub>	clorofórmio deuterado
CIM	Concentração inibitória mínima
CG	Cromatografia Gasosa
CG-EM	Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massas
COSY	Espectrometria bidimensional de correlação homonuclear a três ligações
d	dublete
dd	duplo dublete
DCM	Diclorometano
DEPT	distorsionless enhancement by polarization transfer
DI <sub>50</sub>	Dose Inibitória de 50%
EtOH	Etanol
HETCOR	Espectrometria bidimensional de correlação heteronuclear a uma ligação
HETCOR LR	Espectrometria bidimensional de correlação heteronuclear a duas e três ligações
IM	Inibição Máxima
INEPT	Insensitive nuclei enhanced by polarization transfer
i.p.	intraperitoneal
m	multiplete
p	significância em análise estatística
s	singlete
sl	singlete largo
t	triplete
φi	diâmetro interno

## RESUMO

O presente trabalho envolveu especialmente a extração, o isolamento e a identificação de constituintes químicos presentes nas cascas de *Drimys angustifolia* e cascas, caules e folhas de *Drimys brasiliensis*.

Das cascas de *D. angustifolia* foram obtidos dois novos sesquiterpenos drimanos, os quais foram denominados como drimanial e 1- $\beta$ -(p-metoxicinamil)-isopoligodial. Foram isolados também o poligodial, isopoligodial, mukaadial, 1- $\beta$ -(p-metoxicinamil)-poligodial, 1- $\beta$ -(p-cumaroiloxi)-poligodial, bem como uma mistura de dois compostos derivados de drimanos que parecem ser inéditos. Dos compostos conhecidos o 1- $\beta$ -(p-cumaroiloxi)-poligodial não foi citado na espécie estudada e o mukaadial não foi anteriormente encontrado no gênero *Drimys*. Foi verificada a presença de drimenol através de CG/EM.

Da espécie *D. brasiliensis*, isolou-se das cascas os sesquiterpenos drimanos poligodial, drimanial, 1- $\beta$ -(p-metoxicinamil)-poligodial e epifuegina. Dos compostos isolados, somente o poligodial havia sido relatado para esta espécie, sendo que o drimanial foi isolado pela primeira vez durante este trabalho da espécie *D. angustifolia* e a epifuegina ainda não havia sido descrita na literatura. Dos caules de *D. brasiliensis* foram isolados uma mistura de ácidos e álcoois graxos e das folhas de *D. brasiliensis* foram isolados uma mistura de ácidos e álcoois graxos, bem como uma mistura de  $\alpha$  e  $\beta$  cubebina. Estas lignanas ainda não haviam sido relatadas para esta espécie.

As estruturas foram estabelecidas por análises espectrométricas (IV, EM, RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e 2D) e por comparação com os dados existentes na literatura.

Considerando o razoável rendimento e a promissora atividade farmacológica do poligodial, foram realizadas modificações estruturais em sua estrutura. Obteve-se êxito na redução dos grupos aldeídicos, na formação da oxima, no derivado 2,4-dinitrofenilidrazona e no derivado p-aminoacetofenona. Na reação com bromo ocorreu a formação de um produto inesperado, ainda não totalmente identificado. Verificou-se também que o poligodial, solubilizado em etanol e sob refluxo, converte-se no seu epímero o isopoligodial.

Determinou-se o perfil cromatográfico por cromatografia gasosa de frações dos extratos CHCl<sub>3</sub> das cascas, caules e folhas da *D. brasiliensis*. Observou-se, pelos espectros de massas, a presença dos drimanos somente nas cascas.

Os extratos e alguns compostos purificados foram testados com relação à atividade alelopática, fungicida e antinociceptiva. Verificou-se que o extrato CHCl<sub>3</sub> das cascas e os compostos poligodial, drimanial e 1-β-(p-cumaroiloxi)-poligodial apresentaram efeito inibitório do crescimento de *Lactuca sativa* e *Clusia parviflora*. Os extratos DBC CHCl<sub>3</sub> e DBF CHCl<sub>3</sub> (caules e folhas) e os 3 extratos metanólicos (cascas, caules e folhas), comportaram-se da mesma maneira, promovendo estímulo a partir da concentração de 750 ppm quando testados em *Lactuca sativa*. O extrato DB CHCl<sub>3</sub> (cascas) apresentou significativa atividade contra os fungos *M. canis*, *M. gypseum*, *E. floccosum*, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *C. tropicalis* e *C. neoformans*. O extrato DBC CHCl<sub>3</sub> (caules) também apresentou atividade para alguns fungos, porém a atividade não foi tão pronunciada quanto à das cascas. O poligodial apresentou grande atividade antifúngica contra os fungos *E. floccosum* e *T. rubrum*. O 1-β-(p-metoxicinamil)-poligodial mostrou-se ativo contra *M. canis*, *M. gypseum*, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* e principalmente contra *E. floccosum*. Quanto à atividade antinociceptiva ou analgésica, o poligodial, drimanial e o 1-β-(p-metoxicinamil)-poligodial apresentaram atividade quando testado no modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos. O poligodial e drimanial também foram testados no modelo de dor induzida pela formalina e apresentaram atividade. Estes compostos foram mais ativos do que a aspirina nos modelos testados.

Os resultados permitem confirmar a presença de vários princípios ativos nas espécies em questão, justificando o uso medicinal, especialmente das cascas, destas espécies.

## ABSTRACT

The present work describes the extraction, isolation and identification of the chemical constituents in the bark of *Drimys angustifolia* and bark, stems and leaves of *Drimys brasiliensis*.

From the bark of *D. angustifolia* were obtained two new drimane sesquiterpenes, which were denominated as drimanal and 1- $\beta$ -(p-methoxycinnamyl)-isopolygodial. Also were isolated the polygodial, isopolygodial, mukaadial, 1- $\beta$ -(p-methoxycinnamyl)-polygodial, 1- $\beta$ -(p-coumaroyloxy)-polygodial, as well as a mixture of two compounds derived of drimanes that seems to be unpublished, and drimenol was verified by GC/MS. Of the well-known compounds, 1- $\beta$ -(p-coumaroyloxy)-polygodial was not mentioned in the studied specie and mukaadial was not previously found in the genus *Drimys*.

From the bark of *D. brasiliensis*, were isolated the drimane sesquiterpenes polygodial, drimanal, 1- $\beta$ -(p-methoxycinnamyl)-polygodial and epifuegin. Of the isolated compounds, only polygodial had been found in this specie. Drimanal was isolated for the first time during this work of the *D. angustifolia* and epifuegin had not yet been described in the literature. From the stems and leaves of *D. brasiliensis* a mixture of fatty acids and alcohols was isolated, a mixture of the  $\alpha$  and  $\beta$  cubebin was also isolated from the leaves. These lignans have not yet been mentioned in this specie.

The structures were established by spectral analysis (IV, ME,  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR and 2D) and for comparison with data in the literature.

Considering the reasonable revenue and the promising pharmacological activity of polygodial, structural modifications were accomplished in its structure. It was obtained success in the reduction of the aldehydes groups, in the formation of the oxime, in derived 2,4-dinitrophenylhydrazone and in derived p-aminoacetophenone. In the reaction with bromine happened the formation of an unexpected product, still not totally identified. It was also verified that the polygodial, solubilized in ethanol and under reflux, turns into its epimer the isopolygodial.

The profile chromatographic was determined by gaseous chromatography of the  $\text{CHCl}_3$  extracts of bark, stems and leaves of the *D. brasiliensis*. It was observed, in the mass spectrum, the presence of the drimanes only in the bark.

The extracts and some purified compounds were submitted to allelopathic, fungicide and antinociceptive activities tests. It was verified that the  $\text{CHCl}_3$  extract of bark and the compounds polygodial, drimaniol and 1- $\beta$ -(p-coumaroyloxy)-polygodial presented inhibitory effect in the growth of *Lactuca sativa* and *Clusia parviflora*. The DBC  $\text{CHCl}_3$  and DBF  $\text{CHCl}_3$  extracts (stems and leaves) and the 3 extracts methanol (bark, stems and leaves), behaved in the same way, promoting stimulation starting from the concentration of 750 ppm, when tested in *Lactuca sativa*. The DB  $\text{CHCl}_3$  extract (bark) presented significant activity against the mushrooms *M. canis*, *M. gypseum*, *E. floccosum*, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *C. tropicalis* and *C. neoformans*. The DBC  $\text{CHCl}_3$  extract (stems) also presented activity against some mushrooms, although its activity was not so pronounced with relationship than one of the bark. The polygodial presented great antifungal activity against the mushrooms *E. floccosum* and *T. rubrum*. The 1- $\beta$ -(p-methoxycinnamyl)-polygodial showed activity against *M. canis*, *M. gypseum*, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* and mainly against *E. floccosum*. The antinociceptive or analgesic activity of drimaniol was presented when tested in the pain model induced by the formalin and in the model of abdominal constriction induced by the acetic acid in mice.

The results confirmed the presence of several active compounds in the studied species, justifying the medicinal use, especially of the bark, of these species.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. ASPECTOS GERAIS

O uso de plantas medicinais como fonte de alívio para enfermidades é relatado a mais de 5.000 mil anos. Hoje as plantas são fontes importantes de medicamento para a maioria da população mundial. Atualmente, o elevado padrão tecnológico sustenta-se em larga extensão, na permanente introdução de novos produtos químicos. Neste contexto, os vegetais têm sido importantes fornecedores destes novos produtos, tanto ao nível de substâncias químicas propriamente ditas, como de modelos necessários para a sua produção industrial, por síntese ou cultivo de células.<sup>1,2</sup> Nos últimos dez anos os produtos naturais tem sido utilizados como fonte de fitoterápicos (misturas ou extratos de plantas) com importantes propriedades terapêuticas.

O potencial químico dos vegetais estimula o interesse de indústrias alimentícias (para a obtenção de produtos naturais para dar cor e sabor aos alimentos), cosméticas (pela necessidade de perfumes naturais), farmacêuticas (como fonte de fármacos) e agroquímicas (pelo fornecimento de herbicidas, fungicidas e inseticidas naturais), entre outros.<sup>3</sup>

A importância de produtos naturais de origem vegetal no desenvolvimento de substâncias biologicamente ativas tem evoluído consideravelmente. Porém, entre 500.000 espécies de plantas estimadas, apenas um pequeno percentual foi investigado fitoquimicamente e a fração submetida à investigação farmacológicas ou biológicas ainda são menores. Para exemplificar, pode-se ressaltar que o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos investigou a atividade antitumoral de cerca de 35.000 espécies de plantas nos anos de 1957 a 1981. Na década de 90 adquiriu mais 20.000 espécies da América Latina, África e sudoeste da Ásia. Porém, a grande maioria destas plantas não será investigada com respeito a qualquer outra atividade. Os dados disponíveis revelam que apenas 15 a 17% das plantas foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal ou fitoquímico.<sup>4-5</sup>

A química de produtos naturais está inserida dentro de um amplo contexto interdisciplinar, pois envolve áreas como a botânica (classificação da planta), farmacologia e microbiologia (testes farmacológicos e microbiológicos), espectroscopia (elucidação estrutural), entre outras, sendo altamente relevante no desenvolvimento de novas moléculas com potencial terapêutico.<sup>6</sup>

## **1.2. PRODUTOS NATURAIS (METABÓLITOS SECUNDÁRIOS)**

A natureza produz uma grande variedade de produtos na química combinatória de sua evolução. Para se ter uma idéia, o número total de produtos naturais produzidos por plantas está estimado em torno de 500.000.<sup>7</sup>

Os produtos naturais foram divididos em dois grupos: METABÓLITOS PRIMÁRIOS e METABÓLITOS SECUNDÁRIOS. Os metabólitos primários são encontrados em todos os sistemas vivos, essenciais ao crescimento e a vida. Ex. aminoácidos de proteínas, monossacarídeos, ácidos carboxílicos do ciclo de Krebs, lipídeos, glicerídeos, etc. Os metabólitos secundários são produtos do metabolismo específico, relacionado a processos adaptativos. São biossintetizados a partir de metabólitos primários, com distribuição restrita a certas plantas e microorganismos (às vezes característico de um dado gênero ou espécie); e caracterizados por uma enorme diversidade química, ex. alcalóides, esteróides, terpenóides, flavonóides, etc.<sup>5</sup> Para um químico, o termo “produto natural” é sinônimo de metabólito secundário.

Durante muito tempo, os metabólitos secundários foram considerados como produtos de excreção do vegetal, com estruturas químicas e, algumas vezes, propriedades biológicas interessantes. Agora é reconhecido que muitos deles tem papéis vitais como mediadores em interações ecológicas, como por exemplo, a defesa contra herbívoros e microorganismos, a proteção contra os raios UV, a atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes e em interações alelopáticas.<sup>8</sup>

Os metabólitos secundários podem ser classificados de diferentes maneiras, segundo suas características químicas, origem da planta ou origem biossintética. Do ponto de vista químico, os compostos podem ser divididos em várias classes,



que são baseadas em certas características. Por exemplo, os alcalóides são caracterizados por um nitrogênio básico. Os fenólicos, que são caracterizados por um sistema aromático, tem um grupo hidroxila fenólico. Outros grupos ou subgrupos são baseados na presença de certos tipos de esqueletos básicos como antracenos, cumarinas, quinonas, etc. Exemplos de classificação baseadas na origem da planta são os alcalóides do opium e glicosídeos digitálicos. Estes são freqüentemente relacionados com aplicações farmacológicas. A classificação baseada na origem biossintética tem como principal exemplo os terpenóides, fenilpropanóides e policetídeos. Todos os terpenóides derivam da rota biosintética do isoprenóide  $C_5$ , os quais são unidos em blocos para formar  $C_{10}$  (monoterpenos),  $C_{15}$  (sesquiterpenos),  $C_{20}$  (diterpenos),  $C_{30}$  (triterpenos) e  $C_{40}$  (carotenóides). Os outros dois grupos mencionados são construídos a partir da fenilalanina/tirosina  $C_9$  e acetato  $C_2$ , dos quais os fenilpropanóides e policetídeos, respectivamente, são derivados.<sup>5</sup>

Portanto, a química de produtos naturais tem por objetivo imediato o esclarecimento e registro dos constituintes resultantes do metabolismo secundário, através de seu isolamento e elucidação de suas estruturas moleculares.<sup>9</sup>

### **1.3. INTERAÇÃO ENTRE QUÍMICA DE PRODUTOS NATURAIS E FARMACOLOGIA**

A pesquisa de novos agentes farmacologicamente ativos obtidos de fontes naturais como micróbios, fermentações e extratos de plantas, tem conduzido para a descoberta de muitos fármacos clinicamente úteis no tratamento de enfermidades humanas. Sabe-se que 60% dos agentes antitumorais e anti-infecciosos que estão atualmente disponíveis comercialmente ou em estudos finais de triagens clínicas são de origem natural.<sup>10</sup>

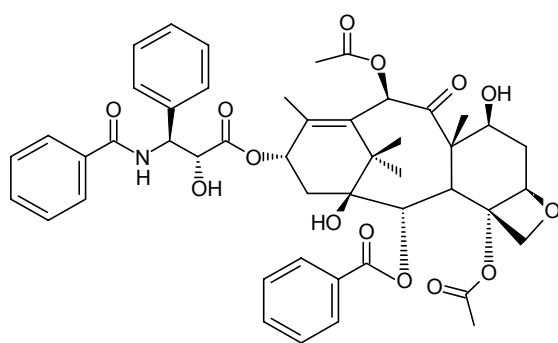
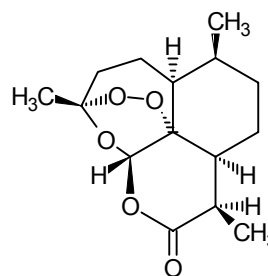
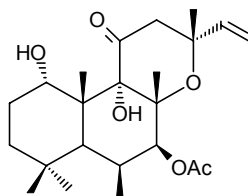
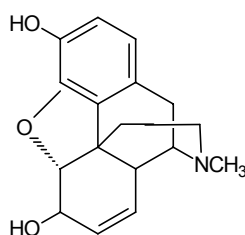
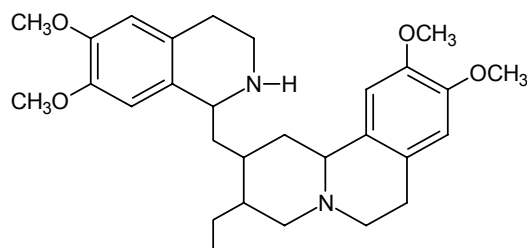
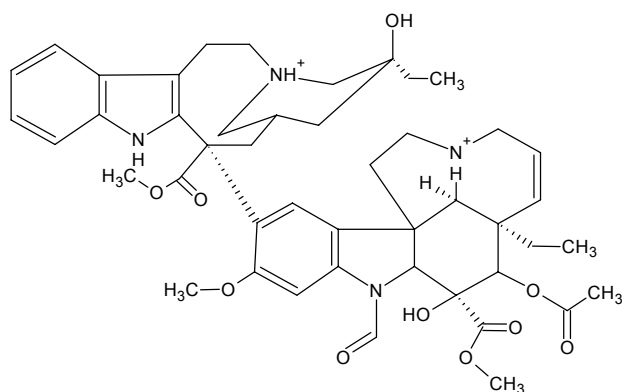
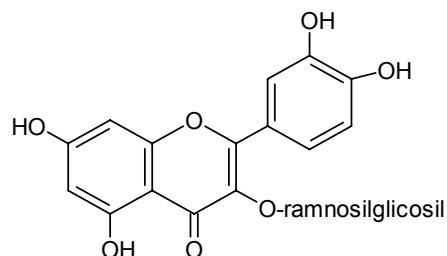
As principais áreas da pesquisa em plantas bioativas são; tratamento do câncer; doenças infecciosas; inflamação dor e alergia; controle de doenças tropicais; regulação da fertilidade; e atividade sobre o sistema nervoso central. A busca por compostos antivirais tem sido estimulada pela rápida disseminação da

AIDS. Na área de doenças tropicais, estão sendo desenvolvidos programas para a avaliação de uma grande quantidade de atividades biológicas, entre os quais, antiprotozoários (malária, amebíase, leishmaniose, tripanossomíase), moluscidas, cercariscidas e esquistomicidas, larvicidas e inseticidas.<sup>2,4,11-17</sup>

Através dos tempos, o interesse da indústria farmacêutica em produtos naturais tem sido algumas vezes um fenômeno cíclico. Nos primórdios do século dezoito, teve início uma nova era no uso de plantas medicinais, com o começo de pesquisas médicas modernas nesta área. Entretanto, após 1945, a ênfase se afastou dos fármacos derivados de plantas devido ao grande desenvolvimento da química farmacêutica sintética e da fermentação microbiana. Durante este período, os metabólitos vegetais foram investigados principalmente sob o ponto de vista fitoquímico e quimiotaxonômico. Nas últimas décadas, entretanto, o interesse sobre os fármacos de origem vegetal tem crescido muito. O consumo de plantas medicinais quase duplicou na Europa ocidental durante este período. As principais razões para esta renovação podem ter sido as preocupações ecológicas, e a busca de terapias não clássicas. Nos anos 70 a Organização Mundial da Saúde (OMS) reconheceu o valor das plantas medicinais. Assim, as grandes indústrias farmacêuticas estão demonstrando interesse renovado por plantas como fontes de novos medicamentos.<sup>18-19</sup> O mercado mundial de medicamentos movimenta em torno de US\$ 250 bilhões por ano. Para se ter uma idéia do valor dos produtos naturais, de todos os medicamentos aprovados nos anos de 1983-94, aproximadamente 6% são produtos naturais, 24% são derivados de produtos naturais e 9% baseados em produtos naturais. Se tomar como base os antibióticos a percentagem de produtos naturais e derivados é superior a 78%, já para os antitumorais fica em torno de 60%.<sup>5</sup>

Como exemplos de fármacos obtidos diretamente de plantas tem-se o diterpenóide taxol (**1**), isolado da casca de *Taxus brevifolia* (Taxaceae), que também é encontrado em outras espécies. Este é um dos compostos-modelo mais promissores originado da pesquisa de agentes tumorais a partir de produtos naturais, constituindo uma grande esperança para pessoas portadoras de câncer nos ovários, mama e pulmões.<sup>2</sup> O composto anti-malárico mais promissor descoberto até hoje é a artemisina (**2**), uma lactona sesquiterpênica isolada da *Artemisia annua* L. (Asteraceae). Esta planta tem sido usada a mais de 2000 anos

na China como antifebrífugo e no tratamento da malária.<sup>20</sup> Na busca por substâncias cardiovasculares vale mencionar a forskolina (**3**), obtida de *Coleus forskohlii* (Labiatae) que possui efeito hipotensivo e antiespasmódico.<sup>6</sup> Cabe mencionar também que a morfina (**4**), a emetina (**5**), a vincristina (**6**) e a rutina (**7**), entre outros, são fármacos de origem vegetal, até hoje amplamente utilizados na clínica.<sup>9</sup>

Taxol (**1**)Artemisina (**2**)forskolina (**3**)morfina (**4**)emetina (**5**)vincristina (**6**)rutina (**7**)

#### 1.4. INTERAÇÃO ENTRE QUÍMICA DE PRODUTOS NATURAIS E ECOLOGIA

Existem duas áreas de pesquisa, onde os metabólitos secundários de plantas são importantes na ecologia vegetal, as interações planta-planta e planta-animal.

Os compostos vegetais podem alternativamente atuar como atraentes ou repelentes de alimentação, ter efeitos hormonais sobre os insetos ou fornecer aos insetos um mecanismo útil de defesa contra a predação. Os compostos conhecidos até o presente, os quais estão envolvidos em interações planta-animal, são principalmente rotenóides, piretróides, alcalóides, glicosídeos cardiotônicos, esteróides e terpenos voláteis.<sup>1,21</sup>

As principais plantas das quais são obtidas substâncias com atividade inseticida pertencem aos gêneros *Nicotiana*, produtoras de nicotina e nornicotina; *Derris*, *Lonchocarpus*, *Tephrosia* e *Mundulea*, produtoras de rotenóides e *Chrysanthemum*, produtoras de piretrinas.<sup>22</sup>

As interações planta-planta são conhecidas como ALELOPATIA. Este termo foi descrito por Molish em 1937 e tem sido entendido como a produção de biomoléculas específicas, por uma planta, sobretudo metabólitos secundários, que podem induzir sofrimento ou dar benefício para outra planta. Este conceito sugere que as biomoléculas (aleloquímicos) produzidas por uma planta são liberadas para o ambiente e subsequentemente influenciam no crescimento e desenvolvimento de outra planta.<sup>23</sup> Em 1996, a IAS (Sociedade Internacional de Alelopatia) ampliou a definição de alelopatia aos processos que envolvem a produção de metabólitos secundários por plantas, microrganismos, vírus e fungos, que influenciam no crescimento e desenvolvimento de sistemas agrícolas e biológicos.<sup>24</sup>

As plantas têm a capacidade de produzir aleloquímicos em todos os seus órgãos, porém, muito pouco se conhece sobre a liberação destes aleloquímicos, ou sobre o mecanismo celular envolvido na liberação. Esta área demonstra um importante foco para investigação.<sup>25</sup>

Uma vez liberados para o meio ambiente pelas plantas doadoras, os compostos alelopáticos entram em contato com as plantas receptoras por um mecanismo muito sutil e difícil de determinar corretamente, devido aos sintomas produzidos pelas plantas. Os fatores são freqüentemente secundários na natureza e influenciam nos processos fisiológicos e biológicos. Basicamente, reconhece-se que os agentes aleloquímicos podem afetar funções como:

- a absorção de nutrientes,
- a regulação do crescimento,
- a fotossíntese,
- a respiração,
- a permeabilidade da membrana,
- a síntese protéica e
- a atividade enzimática

O fato de uma mesma substância afetar diversas funções fisiológicas da planta, assim, como a constatação de que uma mesma função possa ser afetada por mais de um composto é mais um fator que complica no entendimento das inter-relações entre efeitos e causas. Certas cumarinas, por exemplo, tem sido citadas como capazes de afetar diferentes funções fisiológicas das plantas, que vão desde a inibição da fotossíntese à respiração e a síntese protéica. Por outro lado, atividades fisiológicas como a respiração pode ser afetada por um conjunto de compostos aromáticos, fenólicos, cumarinas, aldeídos e flavonóides.<sup>26-28</sup>

De um modo geral, se conhece duas formas de alelopatia em plantas: a alelopatia resultante da decomposição de material no solo e a alelopatia que se origina do aleloquímico existente na planta.<sup>27</sup>

Muitas substâncias são conhecidas como sendo aleloquímicas, incluindo as cumarinas, os terpenóides, as quinonas, os taninos, os alcalóides, os ácidos aromáticos, as lactonas, os flavonóides e muitos outros compostos.<sup>29-32</sup>

Em geral, são realizados bioensaios de germinação e crescimento para se constatar a atividade alelopática. Na grande maioria das vezes os resultados dos bioensaios de germinação são expressos na forma de percentagem de germinação. Já nos ensaios de crescimento e desenvolvimento das plantas, avalia-se através da medida do alongamento da radícula e do hipocótilo, que geralmente é mais sensível que os ensaios de germinação.<sup>23</sup>

Desta forma os produtos naturais são uma fonte atrativa de aleloquímicos e conseqüentemente, modelos de herbicidas naturais.

## **1.5. PROCEDIMENTOS GERAIS PARA A OBTENÇÃO DE PRINCÍPIOS ATIVOS DE PLANTAS**

### **1.5.1. SELEÇÃO DA PLANTA E PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS**

A escolha da planta a ser estudada nem sempre é uma tarefa fácil, devido a grande variedade de espécies existentes. Porém, dependendo do objetivo do estudo, a escolha pode ser orientada. Por exemplo, para plantas com interesse farmacológico, deve-se levar em conta as informações da medicina popular. Como exemplo pode-se citar a *Coleus forskolii*, já usada pelos ancestrais hindus, da qual foi extraído a forskolina (**3**), um agente anti-hipertensivo. Outros aspectos importantes que devem ser levados em consideração são as informações botânicas e químico-taxonomias.<sup>33,34</sup>

A composição química, na maioria dos casos, pode variar nas distintas partes da planta. Muitas vezes, uma mesma espécie botânica que ocorre em diferentes regiões, pode apresentar diferenças na composição química. Outros fatores que devem ser levados em conta são o clima, tipo de solo, época de coleta, etc. Portanto é de grande importância que sejam determinadas a data e as características do local de coleta.<sup>35</sup>

A preparação dos extratos brutos das plantas é o ponto de partida para uma posterior purificação. A escolha do solvente para extração deve ser feita tendo em vista os objetivos do estudo e os resultados da abordagem. Para se ter uma extração eficiente é necessário usar solventes puros e condições brandas, utilizando sempre que possível, solventes de baixa reatividade. Nunca deve ser descartada a possibilidade de formação de artefatos.<sup>36</sup>

Outro aspecto importante a ser considerado é o processo utilizado na extração, que pode influenciar consideravelmente os resultados do estudo experimental. Existem várias técnicas de extração, entre elas; maceração,

percolação, por extrator Soxhlet, etc. Quando se deseja estudar constituintes voláteis, sua extração é iniciada pela destilação por arraste de vapor.<sup>37</sup>

Plantas secas ao ar ou sob baixas temperaturas são extraídas com uma variedade de solventes e algumas vezes seqüencialmente de baixa para alta polaridade. Geralmente se usam solventes polares como etanol ou metanol para fazer a extração e posteriormente faz-se à separação dos compostos por técnicas cromatográficas. Utilizando-se éter para a extração podem ser isolados álcoois sesquiterpênicos e di e triidroxiflavonas. A extração de material mais lipofílico pode ser feita diretamente com diclorometano ou outro solvente de baixa polaridade.<sup>36</sup>

#### 1.5.2. FRACIONAMENTO E ISOLAMENTO

A extração dos constituintes de plantas é um exercício de acertos e erros, no qual se usam diferentes solventes sob as mais variadas condições como tempo e temperatura de extração. O sucesso ou fracasso nos processos de extração pode ser observado posteriormente nos processos de purificação.

Uma vez extraído da planta, o composto bioativo deve ser separado do extrato bruto. O procedimento pode envolver desde uma simples cristalização do composto até separações sucessivas com partições em solventes de polaridades diferentes e extensivas técnicas cromatográficas. A princípio, geralmente é empregada a cromatografia em coluna aberta (CC), onde, dependendo do extrato, a mesma é eluída com uma mistura de solventes que deve ser previamente determinada por cromatografia em camada delgada (CCD). As frações são reunidas e podem ser novamente submetidas à CC ou, dependendo da complexidade, podem ser utilizadas técnicas cromatográficas especiais, como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia de dupla contra-corrente (CDCC), etc. Outra ferramenta útil para a identificação rápida e eficiente de misturas, consiste no uso de cromatografia gasosa ou cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, com os quais, grande parte dos componentes de uma mistura podem ser identificados e quantificados.<sup>33-37</sup>

Deve-se, também, levar em consideração na separação, as características particulares de cada composto, como acidez, polaridade e tamanho molecular. A purificação final, para prover compostos de pureza desejável para as análises estruturais, pode ser acompanhada por técnicas como recristalização, sublimação ou destilação.<sup>36</sup>

A Figura 1 mostra processos de partição e separação prováveis dos principais metabólitos secundários presentes em plantas. Este método é geralmente usado quando não se conhece a natureza dos compostos químicos presentes na planta em estudo; caso contrário podem ser utilizados métodos específicos.<sup>33</sup>

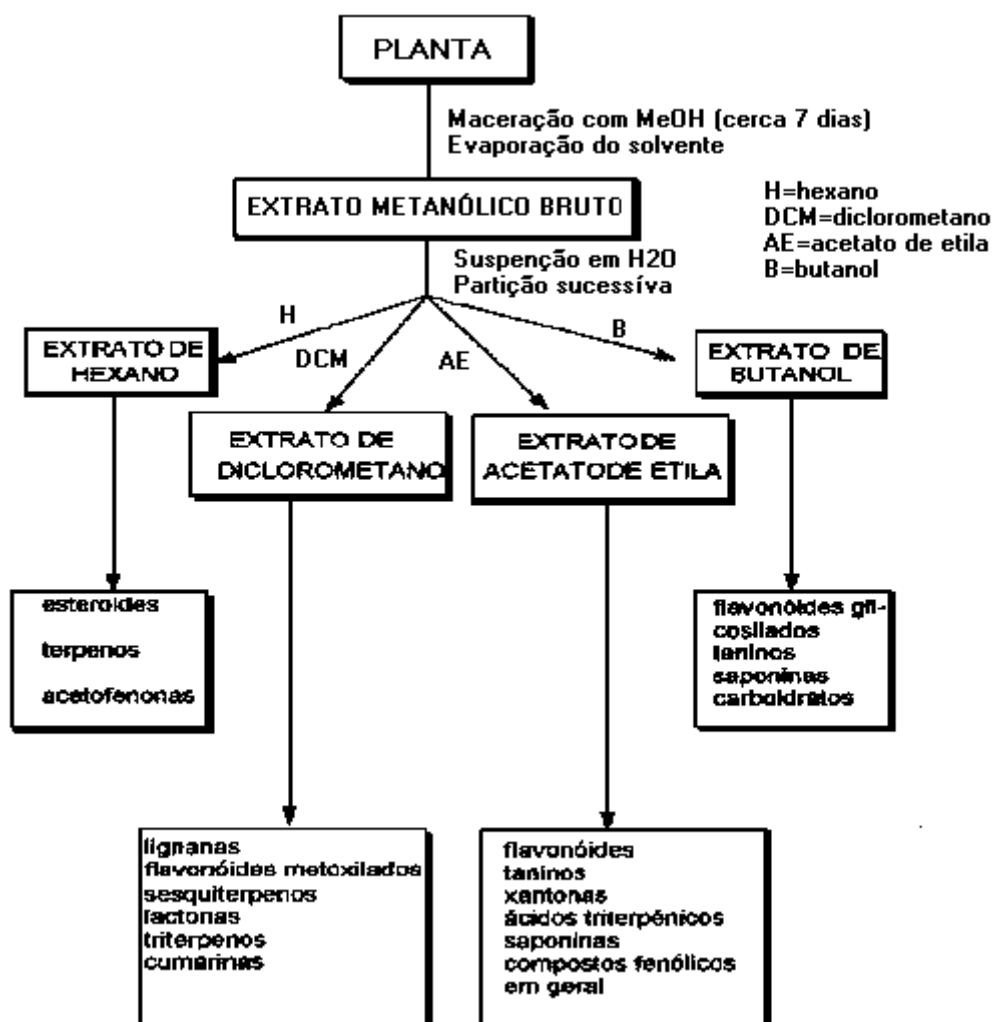


Figura 1 - Procedimento geral de partição e provável separação dos principais metabólitos secundários presentes em plantas.<sup>33</sup>



### 1.5.3. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL

O processo de determinação estrutural envolve o acúmulo de dados de numerosas fontes, cada qual da alguma informação estrutural e a assimilação destes dados fornece a estrutura química.

Existe uma variedade de instrumentação espectroscópica como Ultra Violeta (UV), Infra Vermelho (IV), Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) e Carbono (RMN  $^{13}\text{C}$ ) aliado ao uso de outras técnicas de RMN (NOE, COSY, HETCOR, INADEQUATE, etc) e espectrometria de Massas (EM), que tem permitido propor com segurança a estrutura molecular de substâncias naturais. Nos últimos anos foram desenvolvidas várias técnicas cromatográficas e espectroscópicas hifenadas, como Cromatografia Líquida - Ultra Violeta - Massas e Cromatografia Líquida - Ultra Violeta - Ressonância Magnética Nuclear.<sup>1,2</sup>

Apesar destes auxílios, quando existem ambigüidades na determinação estrutural, modificações químicas ou a degradação do composto desconhecido faz-se necessário. Estes processos posteriores envolvem o tratamento do composto desconhecido com reagentes com grupos especiais específicos ou a degradação deste de uma maneira previsível, até que um composto de estrutura conhecida seja obtido. A partir daí pode-se prever a sua estrutura molecular.<sup>33</sup>

O processo espectroscópico de determinação estrutural deve ser muito bem aliado com a literatura científica. Se o composto ainda não tiver sido descrito, ele pode ser similar a outros já descritos o que ajudará na interpretação dos dados.<sup>38</sup>

Quando a análise dos dados do composto desconhecido não é conclusiva, e se este ou um de seus derivados possuir estrutura cristalina, pode-se fazer o estudo de difração de raio X. Isto envolve a análise com o auxílio de um computador da difração obtida quando um simples cristal é irradiado com raio-X. A interpretação correta dos dados resultará numa figura tri-dimensional da molécula, incluindo a estereoquímica relativa se a molécula for opticamente ativa, em alguns casos a estereoquímica absoluta também pode ser determinada. Estudos de difração de raio-X podem fornecer informações adicionais sobre a forma tri-dimensional da molécula, ângulos e comprimentos de ligações, e possíveis interações intra e intermolecular. A determinação da estereoquímica

torna-se muito importante desde que estruturas enantioméricas podem ter propriedades biológicas diferentes.<sup>6</sup>

Se a análise dos dados estruturais for ambíguo e o estudo de difração de raio-X não pode ser realizado, então a síntese química de precursores de estrutura e estereoquímica conhecidas é suficiente para provar ou não a estrutura proposta.<sup>33</sup>

#### 1.5.4. MODIFICAÇÃO ESTRUTURAL E CORRELAÇÃO ENTRE ESTRUTURA QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA

Quando se isolam compostos biologicamente ativos em quantidade apreciáveis, pode-se fazer estudos de correlação entre estrutura química e atividade biológica visando otimizar os efeitos biológicos. Para isto faz-se modificações na molécula, dependendo de seus grupos reativos. Inicialmente, realizam-se modificações procurando introduzir grupos que conferem ao composto em estudo uma maior ou menor hidrofobicidade, ou grupos doadores e ou retiradores de elétrons, permitindo posteriormente a aplicação de algum método de correlação entre a estrutura química e atividade biológica, que pode ser tanto qualitativo como quantitativo.<sup>33,39</sup>

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA DO GÊNERO *Drimys*

### 2.1. POSIÇÃO TAXONÔMICA DE *Drimys*<sup>40</sup>

Classe: Magnoliophyta  
(Angiosperma)

Classe 1: Magnolitae  
(Dicotyledonae)

Sub classe: Magnoliidae

Ordem: Magnoliales

Família: Winteraceae

Gênero: *Drimys*

Espécies: *angustifolia*  
*brasiliensis*

### 2.2. ASPECTOS BOTÂNICOS DO GÊNERO *Drimys*

A família Winteraceae consiste de árvores e arbustos que habitam as florestas do lado sul do Oceano Pacífico. Ela contém aproximadamente cem espécies com seis ou sete gêneros. Talvez devido à falta de importância econômica e a distribuição restrita, a família Winteraceae não tenha sido tão extensivamente examinada quanto aos seus constituintes químicos.<sup>41</sup>

A família Winteraceae possui a seguinte classificação: *Drimys* seção *wintera* (América Central e do Sul) 4 espécies; *Drymis* seção *tasmania* (Austrália, Nova

Guiné e Ásia) 36 espécies; *pseudowintera* (Nova Zelândia) 2 espécies; *Bubbia* (Austrália, Nova Guiné e Nova Caledônia) 30 espécies; *belliolum* (Ilhas Salomão, Nova Caledônia) 8 espécies; *exospermum* (Nova Caledônia) 2 espécies; *zygogynum* (Nova Caledônia) 6 espécies.<sup>41</sup>

A *Drimys* seção *wintera* é nativa do sul do Brasil e de alguns outros países da América do Sul. Em Santa Catarina, o gênero *Drimys* ocorre em duas espécies, ***Drimys angustifolia* e *Drimys brasiliensis***, as quais são utilizadas na região do Planalto Catarinense, como condimento para carnes, transformando suas cascas em pó e utilizando-as como substituto da pimenta-do-reino. As espécies do sul do Brasil também são utilizadas como estimulante, antiespasmódica, aromática, antidiarréica, antifebril, contra hemorragia uterina, em certas afecções do trato digestivo e, algumas vezes no tratamento do câncer.<sup>42-44</sup>

- *Drimys angustifolia* Miers (*Drimys winteri* J. R. Forst & G. Forst)

Sinônimo: *Drimys winteri* f. *angustifolia* (Miers) Eichl.

Nomes vulgares: Casca-d'anta, casca de anta, cataia

Fenologia: Em Santa Catarina, floresce de julho à novembro e frutifica de agosto à fevereiro.

Encontrada desde 10 até 1800 m de altitude no estado de Santa Catarina.

**Obs.** A *D. winteri* foi reclassificada passando a chamar-se *Drimys angustifolia* Miers. Porém até o momento, todos os trabalhos publicados ainda a chamam de *D. winteri*, inclusive os publicados pelo nosso grupo. A partir de agora será utilizada a nomenclatura correta.<sup>44</sup>

- *Drimys brasiliensis* Miers subsp. *Sylvatica* (Sant Hilaire) Ehrendorfer & Gottsb

Sinônimos: *Drimys granadensis* L. Var. *Sylvatica* St. Hil.

*Drimys granadensis* L. Var. *montana* St. Hil.

*Drimys granadensis* L. Var. *auxiliae* St. Hil.

*Drimys brasiliensis* Miers Var. *Sylvatica* (St. Hil.) Miers

*Drimys brasiliensis* Miers Var. *montana* (Miers) Hauma

*Drimys Montana* (St. Hill) Miers

Nomes vulgares: Casca-d'anta, cataia

Fenologia: Em Santa Catarina, floresce de julho à abril e frutifica a partir de outubro.

Encontrada desde 10 até 1800 m de altitude no estado de Santa Catarina.

A *Drimys angustifolia* (Fig. 2) se distingue da *Drimys brasiliensis*, principalmente pelas suas folhas, em geral bem menores e mais estreitas, com as lâminas estreitamente lanceoladas, elípticas ou levemente espatuladas, bem como, apenas levemente discolores, com face inferior levemente acinzentada ou glabrescente e não prateada como ocorre em *D. brasiliensis*.

A *D. brasiliensis* geralmente está associada a *D. angustifolia*. Contudo se verifica que a *D. brasiliensis* é mais freqüente em áreas não tão expostas à luz, nos capões mais desenvolvidos e nos subbosques dos pinhais mais densos.<sup>44</sup>



Figura 2 – *Drimys angustifolia*

## 2.3. ASPECTOS QUÍMICOS DO GÊNERO *Drimys*

### 2.3.1. CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS NO GÊNERO *Drimys*

Até o momento três espécies pertencentes ao gênero *Drimys* foram estudadas quanto aos seus constituintes químicos, das quais foram isolados principalmente sesquiterpenos e flavonóides, como pode ser observado nas Tabelas 1 a 3.

As estruturas e a nomenclatura dos compostos isolados no gênero *Drimys* estão indicadas nas Fig. 3-5.

Tabela 1 - Metabólitos secundários isolados da *Drimys angustifolia*

Composto	Parte da planta	Referências
<b>Sesquiterpenos drimanos</b>		
Poligodial (8)	Cascas	Cechinel Filho et al, 1998 <sup>45</sup>
	Folhas e ramos	Brown, 1994 <sup>46</sup>
	Folhas	Sierra, Lopes e Cortés, 1986 <sup>47</sup>
	Cascas	Cortés e Oyarzun, 1981 <sup>48</sup>
Isopoligodial (9)	Cascas	Cortés e Oyarzun, 1981 <sup>48</sup>
1-β-(p-metoxicinamil) poligodial (10)	Casca	Cechinel Filho et al, 1998 <sup>45</sup>
Drimendiol (11)	Folhas e ramos	Brown, 1994 <sup>46</sup>
Drimenol (12)	Folhas e ramos	Brown, 1994 <sup>46</sup>
	Folhas	Sierra, Lopes e Cortés, 1986 <sup>47</sup>
	Cascas	Cortés e Oyarzun, 1981 <sup>48</sup>
	Cascas	Appel e Dohr, 1958 <sup>49</sup>
	Cascas	Appel, Rotman e Thornton, 1956 <sup>50</sup>
	Cascas	Appel, 1948 <sup>51</sup>
Isodrimeniol (13)	Folhas e ramos	Brown, 1994 <sup>46</sup>
3-β-acetoxidrimenin (14)	Folhas	Sierra, Lopes e Cortés, 1986 <sup>47</sup>
(11ξ,12ξ)-11,12-di(7-rimen-11-oxi)-11,12-epoxi-7-drimene (15)	Cascas	Aasen et al., 1977 <sup>52</sup>
Criptomeridiol (16)	Cascas	Cruz, Silva e Sammes 1973 <sup>53</sup>

Confertifolina (17)	Cascas	Appel, Bond e Overton, 1963 <sup>54</sup> Appel e Dohr, 1958 <sup>49</sup>
Valdiviolídeo (18)	cascas	Appel, Bond e Overton, 1963 <sup>54</sup>
Fuegina (19)	cascas	Appel, Bond e Overton, 1963 <sup>54</sup>
Winterina (20)	cascas	Appel, Bond e Overton, 1963 <sup>54</sup>
<b>Sesq.Aromadendrona</b>		
Ciclocolorenona (21)	Folhas e ramos	Brown, 1994 <sup>46</sup>
<b>Lignanas</b>		
$\alpha$ -cubebina (22)	Folhas e ramos	Brown, 1994 <sup>46</sup>
$\beta$ -cubebina (23)		Brown, 1994 <sup>46</sup>
<b>Flavonóides</b>		
Taxifolina (24)	Cascas	Cechinel filho et al, 1998 <sup>45</sup>
	Folhas	Reyes et al, 1990 <sup>55</sup>
	Cascas	Cruz, Silva e Sammes 1973 <sup>53</sup>
Astilbina (25)	Cascas	Cechinel Filho et al, 1998 <sup>45</sup>
	Folhas	Reyes et al, 1990 <sup>55</sup>
	Cascas	Cruz, Silva e Sammes 1973 <sup>53</sup>
Taxifolina-3-O-glicosídeo (26)	Folhas	Torres,Pardo e Velasco, 1992 <sup>56</sup>
Quercetina (27)	Folhas	Reyes et al, 1990 <sup>55</sup>
	Folhas	Williams e Harvey, 1982 <sup>41</sup>
	Cascas	Cruz, Silva e Sammes 1973 <sup>53</sup>
Quercetina-3-O-galactosídeo (28)	Folhas	Reyes et al, 1990 <sup>55</sup>
Isoramnetina (29)	Folhas	Reyes et al, 1990 <sup>55</sup>
Quercitrina (30)	Folhas	Reyes et al, 1990 <sup>55</sup>
Circimaritin(5,4'-dihidroxi-6,7-dimetoxiflavona (31)	Cascas	Cruz, Silva e Sammes 1973 <sup>53</sup>
Canferol (32)	Folhas	Williams e Harvey, 1982 <sup>41</sup>
Luteolina (33)	Folhas	Williams e Harvey, 1982 <sup>41</sup>
Apigenina (34)	Folhas	Williams e Harvey, 1982 <sup>41</sup>
<b>Outros</b>		
Safrol (35)	Folhas	Sierra, Lopes e Cortés, 1986 <sup>47</sup>
(-)- $\alpha$ -pineno (36)	Folhas e ramos	Brown, 1994 <sup>46</sup>
(-)-ent-kaureno (37)	Folhas e ramos	Brown, 1994 <sup>46</sup>

---

Tabela 2 - Metabólitos secundários isolados da *Drimys brasiliensis*

Composto	Parte da planta	Referências
<b>Sesquiterpenos drimanos</b>		
Confertifolin ( <b>17</b> )	Partes aéreas	Vichnewki et al., 1986 <sup>57</sup>
Poligodial ( <b>8</b> )	Partes aéreas	Vichnewki et al., 1986 <sup>57</sup>
1-β-p-cumaroiloxipoligodial ( <b>38</b> )	Partes aéreas	Vichnewki et al., 1986 <sup>57</sup>
1-β-p-cumaroiloxivaldiviolideo ( <b>39</b> )	Partes aéreas	Vichnewki et al., 1986 <sup>57</sup>

Tabela 3 - Metabólitos secundários isolados da *Drimys granadensis*

Composto	Parte da planta	Referências
<b>Sesquiterpenos drimanos</b>		
Poligodial ( <b>8</b> )	Cascas	Ferreto et al., 1988 <sup>58</sup>
	Cascas	Ciccio, 1984 <sup>59</sup>
11,12-dimetoxi-11,12-epoxi-7-drimano ( <b>40</b> )	Cascas	Ferreto et al., 1988 <sup>58</sup>
Warburganal ( <b>41</b> )	Cascas	Ferreto et al., 1988 <sup>58</sup>
1-β-(p-cumaroiloxi) poligodial ( <b>38</b> )		Ferreto et al., 1988 <sup>58</sup>
1-β-(p-metoxicinamil) poligodial ( <b>10</b> )	Cascas	Ferreto et al., 1988 <sup>58</sup>
11,12-dimetoxi-11,12-epoxi derivado de 1-β-(p-metoxicinamil) poligodial ( <b>42</b> )	Cascas	Ferreto et al., 1988 <sup>58</sup>
Norsesquiterpeno ( <b>43</b> )		Ferreto et al., 1988 <sup>58</sup>
<b>Flavonóides</b>		
Astilbina ( <b>25</b> )	Casca e caule	Dias, Dias e Bonilla, 1985 <sup>60</sup>
Quercitrina ( <b>30</b> )		Dias, Dias e Bonilla, 1985 <sup>60</sup>



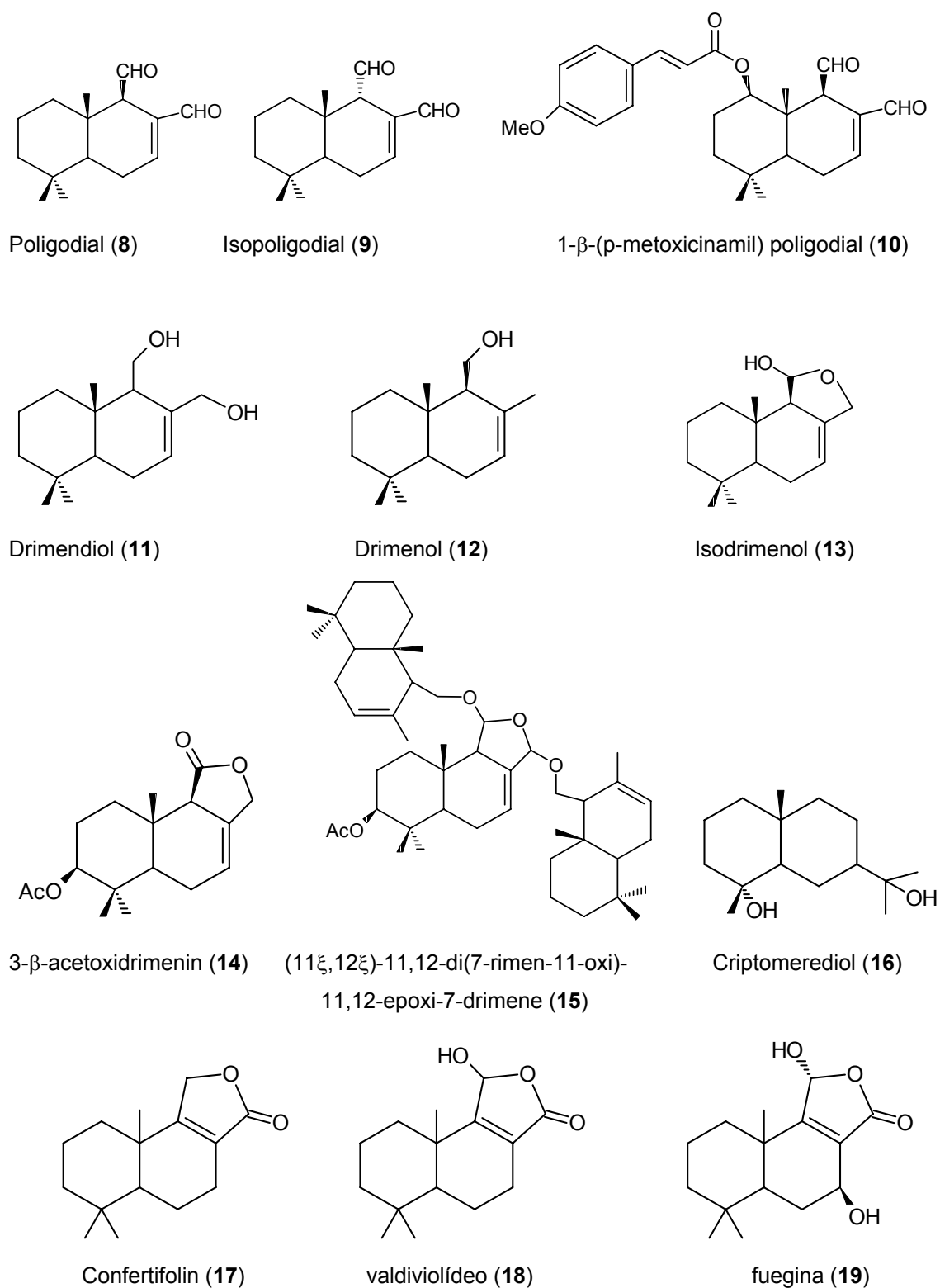


Figura 3 – Estruturas dos sesquiterpenos drimanos isolados no gênero *Drimys*

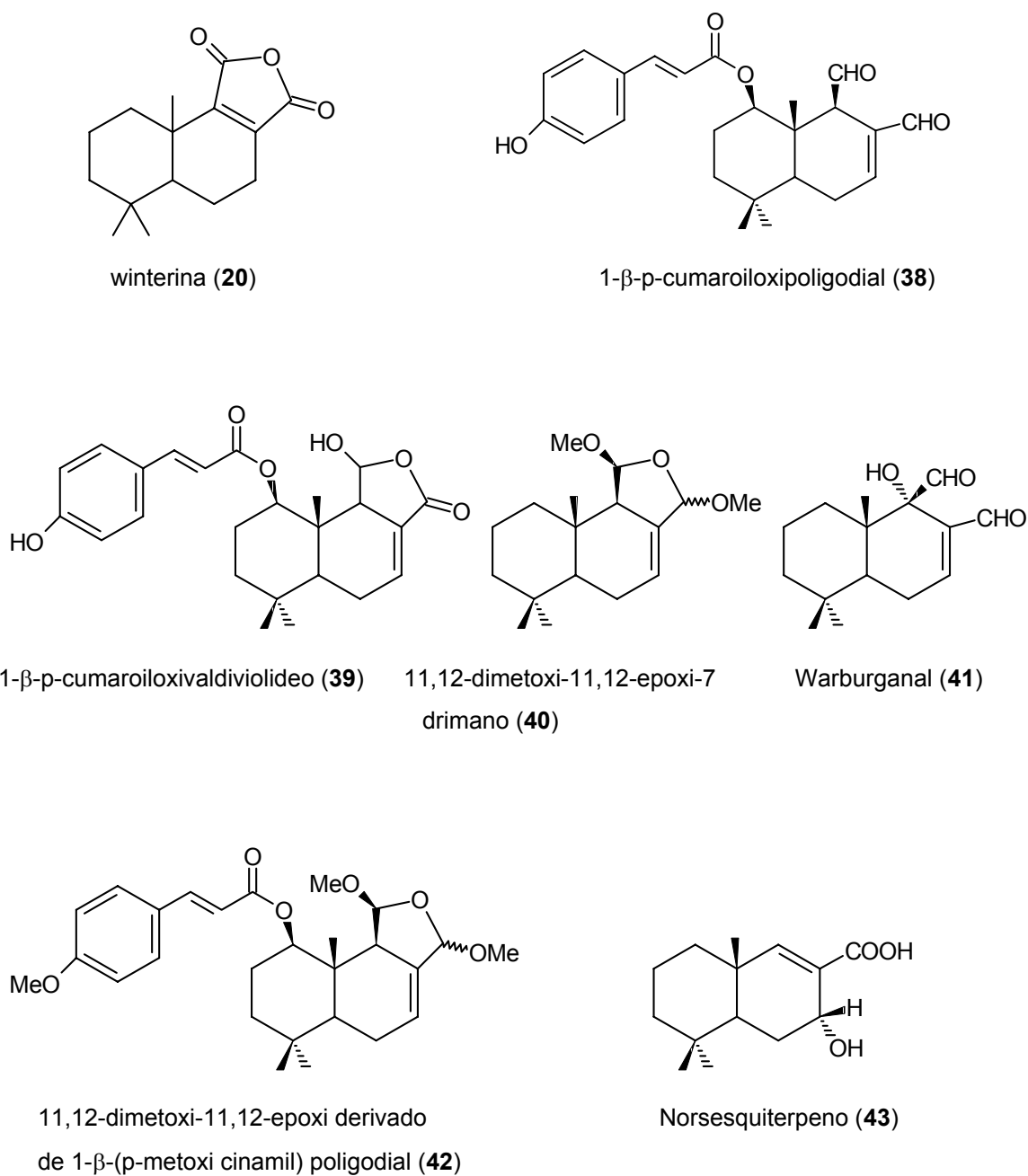


Figura 3 continuação – Estruturas dos sesquiterpenos drimanos isolados no gênero *Drimys*

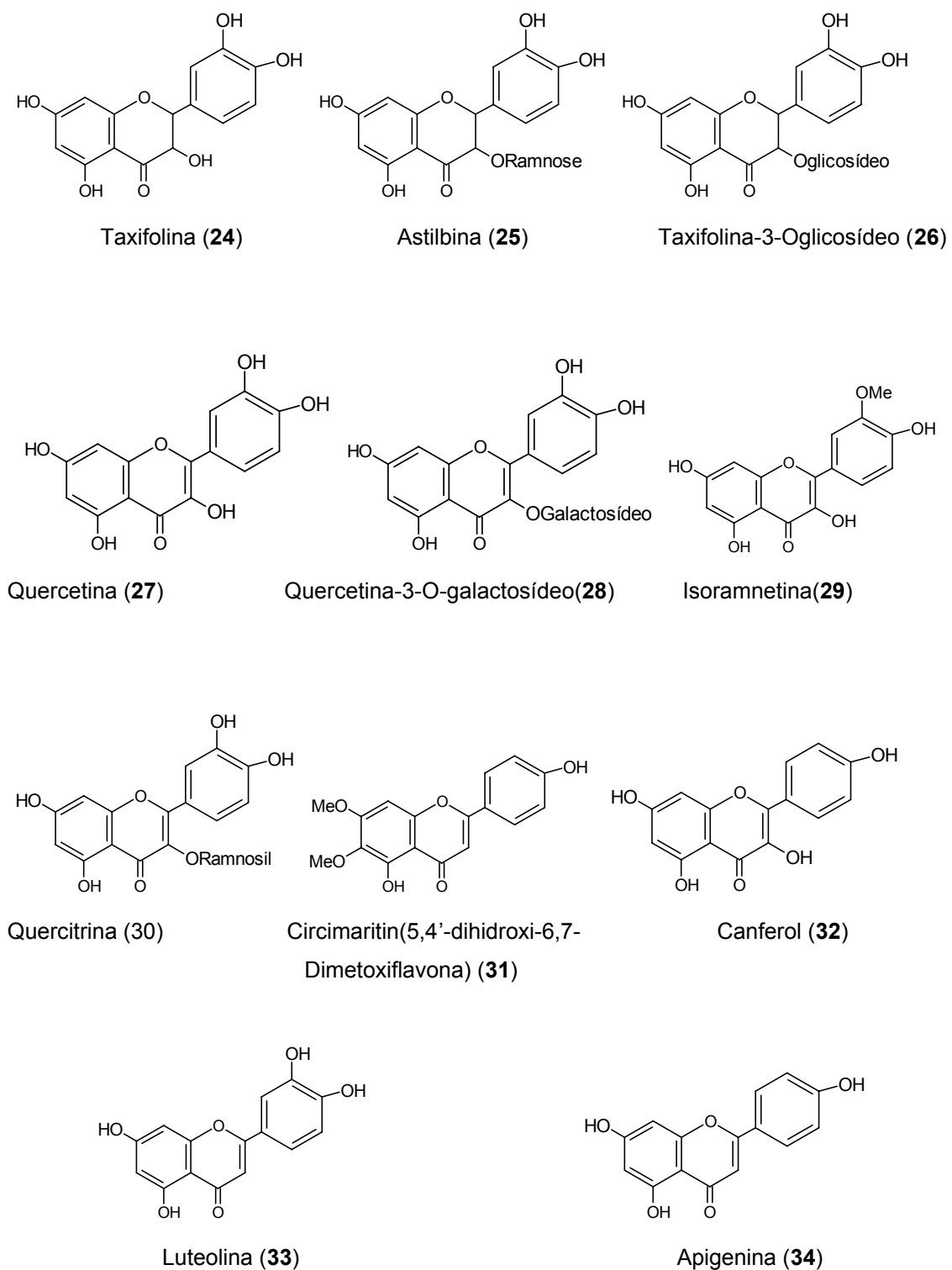


Figura 4 – Estruturas dos flavonóides isolados no gênero *Drimys*

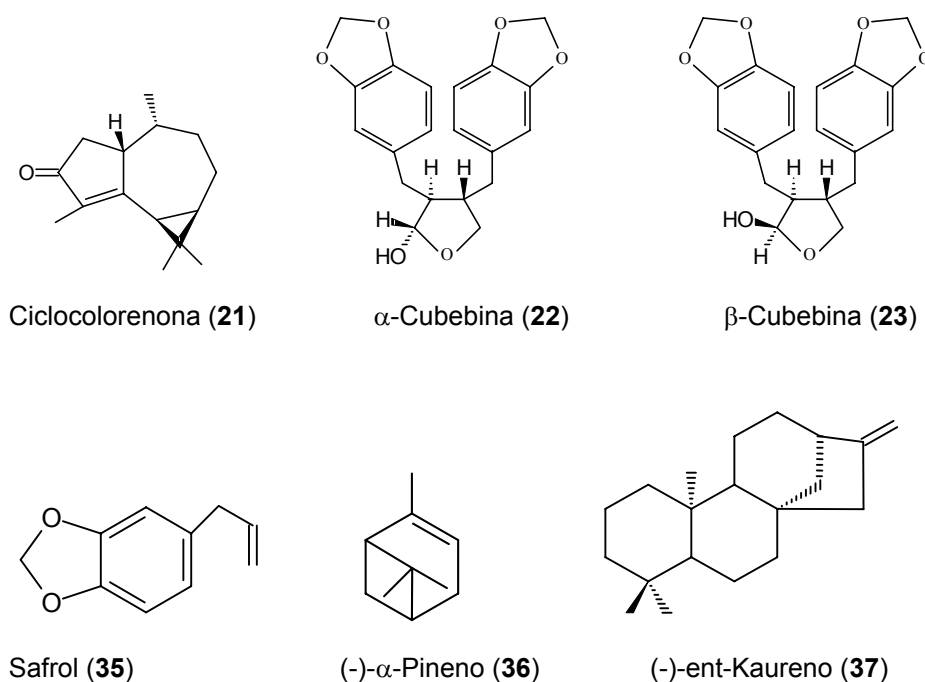


Figura 5 – Outros compostos isolados no gênero *Drimys*

### 2.3.2. SESQUITERPENOS DRIMANOS: ASPECTOS GERAIS

Em 1948, Appel<sup>51</sup> isolou o sesquiterpeno álcool, drimenol (**12**), das cascas de *Drimys winteri* Forst. A estrutura e a configuração absoluta desse composto foi elucidada em 1956<sup>51,61</sup>. Este composto foi o primeiro sesquiterpeno bicíclico com a estrutura e configuração absoluta característica do sistema do anel A,B de muitos di e triterpenos.<sup>62</sup>

O nome DRIMANO foi proposto para o hidrocarboneto saturado, com a estrutura e configuração absoluta demonstrada na Fig 6. A numeração do esqueleto carbônico seguiu o sistema estabelecido por Djerassi em 1954. Os átomos de carbono 11 e 12 são frequentemente oxidados, mas a oxidação em outras posições também pode ser observada. Alguns tipos de rearranjos drimanos são conhecidos como mostrado na Fig. 6, no qual ocorre a migração de um grupo metila do carbono C-4 para o C-3 e a ligação dupla exocíclica permanece no C-4.<sup>62</sup>

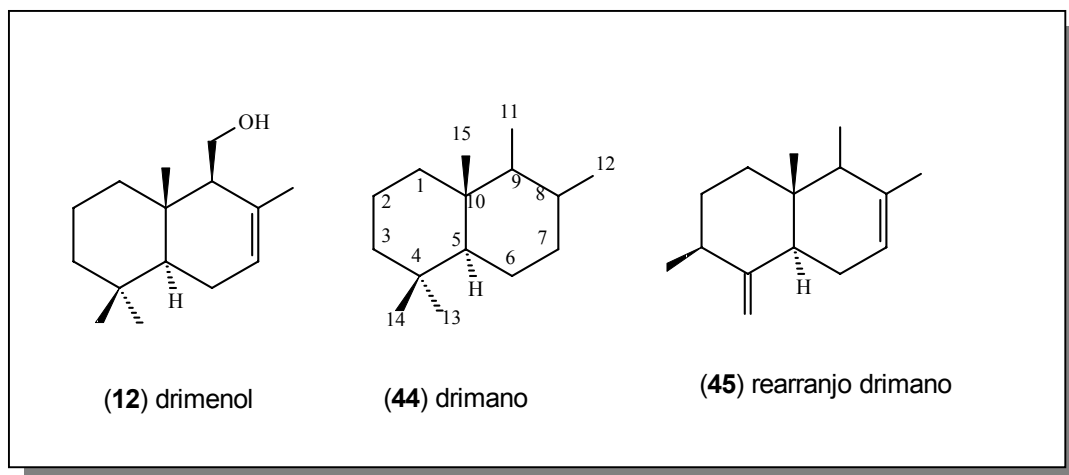


Figura 6 – Esqueleto básico drimano

Muitos drimanos têm sido isolados de várias famílias, dentre as quais Winteraceae, principalmente do gênero *Drimys*. De Cannellaceae, uma pequena família de plantas consistindo de nove espécies, agrupadas em quatro gêneros, destas, *Winterana* e *Cinnamodendron* são endêmicas na América do Sul, *Warburgia* no oeste da África e *Cinnamosma* em Madagascar. Outra fonte rica em drimanos é a *Polygonum hidropiper* (Polygonaceae). A investigação sistemática de compostos ativos da Hepaticaceae também revelou alguns drimanos, especialmente no gênero *Porella*. Alguns álcoois drimânicos foram isolados da *Nicotiana tabacum*.<sup>62-65</sup>

A ocorrência de drimanos não está somente limitada a plantas, eles também foram encontrados em organismos como fungos, moluscos e esponjas.<sup>62,66-73</sup>

A origem biogenética destes compostos ainda não é muito clara, mas eles devem ser biossintetizados do precursor farnesil. A Fig. 7 apresenta a rota biossintética de drimanos. A ciclização é iniciada por um ataque eletrofílico, na ligação dupla da posição cabeça do farnesilpírofosfato ou no correspondente epóxido. A posição da dupla ligação determina a estrutura e a estereoquímica do produto final. A conformação cadeira-cadeira da cadeia poliênica durante a ciclização, pode, em princípio, existir em duas formas enantioméricas, nas quais os dois esqueletos drimanos enantioméricos são derivados. Exemplos de ambos são encontrados na natureza, não na mesma planta.<sup>8,62</sup>

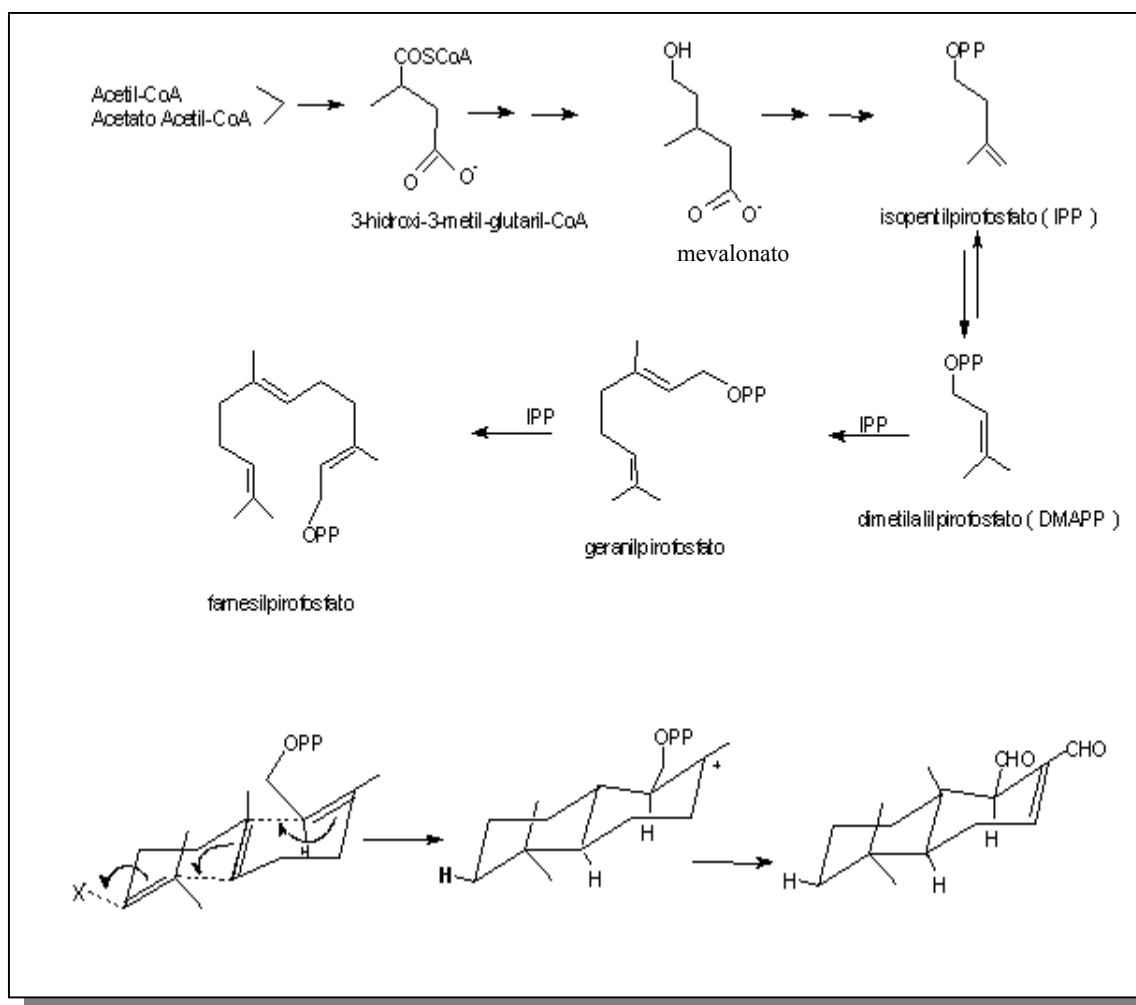


Figura 7 - Rota biossintética de drimanos<sup>62</sup>

Os drimanos possuem uma grande variedade de atividades incluindo antibacteriana, antifúngica, anti-alimentação, inseticida, reguladora de crescimento de planta, citotóxica, etc.<sup>62,74-84</sup>

### 2.3.2.1. *Poligodial*

O poligodial (**8**), um dos principais compostos presentes no gênero *Drimys*, foi isolado pela primeira vez em 1962 da planta *Polygonum hidropiper*. Esta planta é utilizada no Japão como um tempero usado para peixes, e na medicina popular contra o câncer.<sup>85</sup>

Em 1981, Cortés e Yyarzun<sup>48</sup> citaram o isolamento de poligodial e isopoligodial (9) das cascas de *Drimys winteri* coletada no Chile. Esta planta é utilizada contra o escorbuto e diurética. Os autores chamam estes compostos de tadeonal e isotadeonal, respectivamente. Eles relatam que embora poligodial e isopoligodial co-ocorrem em *Polygonum hidropiper*, no caso de *Drimys winteri*, o isopoligodial é um artefato produzido durante o processo de extração.

Sierra e colaboradores<sup>47</sup> também isolaram o poligodial das cascas de *D. winteri*.

Em 1982 um grupo da Universidade de Canterbury<sup>84</sup> relatou o isolamento do poligodial das folhas de *Pseudowintera colorata*. Esta planta medicinal é originária da Nova Zelândia, e foi mais ativa contra *Candida albicans* do que o poderoso antifungo farmacêutico anfotericina B.

Em 1984 Ciccio<sup>59</sup> citou o isolamento do poligodial como o componente majoritário das cascas de *Drimys granadensis*. Ele afirma que o poligodial é responsável pelas propriedades picantes e possivelmente pelo efeito medicinal da mesma.

O poligodial também foi isolado das partes aéreas de *Drimys brasiliensis*.<sup>57</sup>

Um grupo da Universidade Columbia (USA), investigando compostos antialimentação para insetos verificou a presença de poligodial nas cascas da árvore *Warburgia*, encontrada no oeste da África, a mesma é largamente utilizada como tempero para alimentos e também possui atividade antifúngica.<sup>81</sup>

Na Alemanha, Anke e colaboradores<sup>79</sup> testaram a atividade antimicrobiana, fungicida, citotóxica e mutagênica de 20 sesquiterpenos dialdeídos insaturados. O poligodial mostrou ser o mais ativo antifúngico dos 20 testados e não mostrou atividade mutagênica, sendo citotóxico na concentração de 10 vezes da requerida para inibir o fungo e na mesma concentração exibiu ampla atividade antimicrobiana.

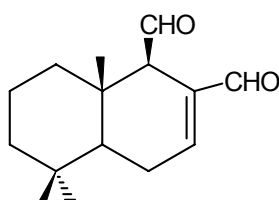
A reatividade de 1, 4 – dialdeídos foi correlacionada com aminas primárias em condições biomiméticas em relação ao seu sabor picante. Verificou-se a dependência da distância entre os dois grupos aldeídos. Poligodial é capaz de reagir com metilamina em condições biomiméticas, enquanto o seu isômero isopoligodial não reage sob as mesmas condições.<sup>83</sup>

Os Departamentos de Química e de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina vêm realizando estudos em conjunto com a *Drimys* desde 1994, onde foram determinadas as propriedades antiinflamatórias, antialérgicas e anti-hiperalgésica do extrato hidroalcolólico das cascas desta planta.<sup>86-88</sup> Em estudos realizados com o poligodial, o composto majoritário das cascas, verificou-se que o mesmo se mostrou ativo em contrações induzidas por vários mediadores químicos que participam da aetilogia de doenças respiratórias<sup>89</sup> e apresentou potente atividade antinociceptiva em camundongos.<sup>45</sup> O mecanismo de ação antinociceptiva parece envolver interação com o sistema opióide.<sup>90</sup> Recentemente, foi demonstrado que o poligodial induz ação vaso-relaxante mediada pela liberação de óxido nítrico (NO) ou por uma substância relacionada (NO) do endotélio vascular,<sup>91</sup> além de atuar nas contrações induzidas por diferentes agonistas da veia portal de ratos in vitro.<sup>92</sup>

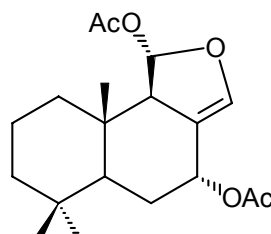
Numa revisão sobre receptores agonistas vaniloides, publicada na Trends in Pharmacological Sciences, aponta-se o poligodial como uma molécula promissora para o desenvolvimento de fármacos, devido ser alvo de uma variedade de caminhos envolvidos na percepção da dor e inflamação.<sup>14</sup>

O poligodial apresenta outras atividades como anti-alimentação para insetos,<sup>75,80</sup> antifúngico<sup>74,76,81</sup> e antibacteriano.<sup>79</sup>

Além de plantas, o poligodial também foi isolado em extratos da pele de moluscos marinhos do gênero *Dendrodoris* (sub ordem *Doridaceae*). *D. limbata* sintetiza o poligodial e o armazena para fins defensivos. Além do poligodial, foi isolado da glândula digestiva do mesmo animal o éster sesquiterpenico (**46**), porém este composto foi inativo. Todos os compostos químicos envolvidos no seu mecanismo de defesa são sesquiterpenos do tipo drimano.<sup>67,69</sup>



(8)



(46)



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVOS GERAIS

Os objetivos gerais do presente trabalho consistem em estudar fitoquimicamente espécies vegetais medicinais brasileiras. Desta forma foram selecionadas as espécies vegetais *Drimys angustifolia* e *Drimys brasiliensis*. Para tanto os procedimentos de isolamento serão orientados para determinação dos constituintes com ações farmacológicas, microbiológicas e alelopáticas.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Isolar, identificar e determinar a estrutura química dos compostos presentes nas cascas de *Drimys angustifolia* e cascas, caules e folhas de *Drimys brasiliensis*;
- b) Realizar testes biológicos (alelopáticos e farmacológicos) com os extratos e compostos puros obtidos;
- c) Realizar modificações químicas na estrutura de compostos ativos, especialmente do poligodol, na tentativa de se obter compostos mais potentes e seletivos;
- d) Determinar o perfil cromatográfico das cascas, caules e folhas de *Drimys brasiliensis* através da técnica de CG/EM.

## 4. PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1. MATERIAIS E MÉTODOS

Os espectros na região de absorção do infravermelho (IV) foram obtidos através de um espectrômetro Perkin -Elmer FT-16-PC, em pastilha de KBr. A referência utilizada foi a absorção em  $1028\text{ cm}^{-1}$ , de um filme de poliestireno.

Os espectros de massas (EM) de baixa resolução foram feitos em espectrômetro SHIMADZU-CG/MS modelo QP 2000<sup>A</sup>, a 70 eV, que é equipado com sonda para sólidos.

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram realizados em espectrômetro BRUKER AC-200F ( $^1\text{H}$  200 MHz;  $^{13}\text{C}$  50MHz) (Universidade Federal de Santa Catarina), ou VARIAN GEMINI 300 ( $^1\text{H}$  300 MHz;  $^{13}\text{C}$  75 MHz) (Universidade Católica de Sacro Cuore/Roma) tendo como referência interna tetrametilsilano (TMS) ou o próprio solvente. Todos os solventes utilizados eram solventes deuterados. Os deslocamentos químicos foram medidos em valores adimensionais ( $\delta$  ppm).

Os cromatogramas foram obtidos em cromatógrafo a gás (CG) SHIMATZU modelo 14 A, com detector de ionização de chama, integrador processador EG 300. As condições adotadas foram as seguintes: fluxo de gases  $\text{N}_2$  e  $\text{H}_2$  30 mL/min, ar sintético 300 mL/min, coluna capilar de sílica fundida de 25 m LM-1, temperatura da coluna  $280\text{ }^\circ\text{C}$ , temperatura do injetor  $280\text{ }^\circ\text{C}$ , temperatura do detector  $310\text{ }^\circ\text{C}$  e sensibilidade de  $2^1 \times 10^1$ .

Nas cromatografias em coluna (c.c.), fez-se uso da sílica gel (0,063-0,200 mesh) MERCK como suporte. O diâmetro e a altura das colunas variaram de acordo com a quantidade de material adsorvido. As eluições foram feitas com solventes orgânicos, em ordem crescente de polaridade. As frações coletadas foram evaporadas à pressão reduzida em evaporador rotativo. As frações foram reunidas conforme as semelhanças de  $R_f$  observadas por cromatografia de camada delgada (c.c.d.).

Na cromatografia em camada delgada (c.c.d.), usou-se sílica gel 60 GF 254 da MERCK. A visualização dos compostos foi feita utilizando-se luz ultravioleta

em comprimentos de onda 254 e 366 nm e pulverização com anisaldeído sulfúrico, seguida por aquecimento em placa.

Os eluentes utilizados para a cromatografia em coluna e camada delgada possuíam grau de pureza P. A, ou foram tratados e destilados de maneira usual.

As frações foram pesadas em balança de precisão SHIMADZU LIBROR AEG-220.

## **4.2. MATERIAL VEGETAL *Drimys angustifolia***

### **4.2.1. COLETA**

As cascas de *Drimys angustifolia* foram coletadas na cidade de Bom Retiro, Santa Catarina, em janeiro de 1997 e identificada pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Leila da Graça Amaral do Depto de Botânica, UFSC. Uma exsicata encontra-se depositada no herbarium FLOR (UFSC) sob. n<sup>o</sup> 26313.

### **4.2.2. OBTENÇÃO DO EXTRATO**

As cascas de *Drimys angustifolia* foram secas, pulverizadas e extraídas por maceração com metanol a temperatura ambiente. O extrato foi concentrado a pressão reduzida em evaporador rotativo à temperatura de 40<sup>o</sup>C até um volume desejado, suspenso em água e então sucessivamente particionado com clorofórmio e acetato de etila, para a obtenção das respectivas frações.

#### **4.2.2.1. Isolamento e purificação dos constituintes da fração $\text{CHCl}_3$**

Os procedimentos utilizados para o fracionamento da fração  $\text{CHCl}_3$  podem ser visualizados na Fig.8.

**OBS.** Só foram relatadas as colunas de onde se isolaram compostos, porém para todos os extratos, muitas outras colunas foram feitas, das quais não se obteve sucesso na purificação.

A fração  $\text{CHCl}_3$  chamada Dw (27 g) foi submetida à cromatografia em coluna ( $\phi$  5,5 cm) de sílica gel (170 g), empacotada com hexano e eluída com hexano e gradualmente enriquecida com acetato de etila e metanol. Foram coletadas 65 frações de 100 mL cada. As frações foram reunidas de acordo com semelhanças observadas por c.c.d.

A fração DW 10-18, eluída com hexano:acetato de etila 9:1 (6,2 g), foi recromatografada em coluna ( $\phi$  3 cm) de sílica gel (30 g), empacotada com hexano, e eluída com hexano e gradualmente enriquecida com acetato de etila e metanol. Foram coletadas 60 frações de 25 mL cada. As frações foram reunidas de acordo com semelhanças observadas por c.c.d. Da fração DW 10-18 9-41, eluída com hexano:acetato de etila 9,5:0,5 e 9,3:0,8, isolou-se o composto **DW-1** (2.53 g). Da Fração 10-18 49-53, eluída com hexano:acetato de etila 9:1, isolou-se o composto **DW-3** (17 mg).

A fração DW 10-18 1-3, eluída com hexano (1,96 g), foi recromatografada em coluna ( $\phi$  3 cm) de sílica gel (54 g), empacotada com hexano e eluída com hexano e gradualmente enriquecida com diclorometano e acetato de etila. Foram coletadas 65 frações de 25 mL cada. As frações foram reunidas de acordo com semelhanças observadas por c.c.d.

A fração DW 10-18 1-3 51-60, eluída com hexano:acetato de etila 9:1 (882 mg), foi recromatografada em coluna ( $\phi$  2 cm) de sílica gel (54 g), empacotada com hexano e eluída com hexano e gradualmente enriquecida com acetona. Foram coletadas 48 frações de 25 mL cada. As frações foram reunidas de acordo com semelhanças observadas por c.c.d. Da fração DW 10-18 1-3 51-60 16-18, eluída com hexano:acetona 6:4, isolou-se o composto **DW-6** (12 mg). Da fração DW 10-18 1-3 51-60 33-37, eluída com hexano:acetona 3:7 isolou-se o composto **DW-8.1** (13,7 mg). Da fração DW 10-18 1-3 51-60 38-40, eluída com hexano:acetona 2:8, isolou-se o composto **DW-8** (24,3 mg).

A fração DW 10-18 4-8, eluída com hexano (1,96 g), foi recromatografada em coluna ( $\phi$  3 cm) de sílica gel (65 g), empacotada com hexano e eluída com hexano e gradualmente enriquecida com diclorometano e acetato de etila. Foram coletadas 60 frações de 25 mL cada. As frações foram reunidas de acordo com semelhanças observadas por c.c.d. Da fração DW10-18 4-8 29-35, eluída com hexano:acetato de etila 9,6:0,4, isolou-se o composto **DW-1.1** (82,3 mg) e da

Fração DW 10-18 4-8 51-60, eluída com hexano:acetato de etila 9:1, isolou-se novamente o composto **DW-1** ( 480 mg).

A fração DW 23-24, eluída com hexano:acetato de etila 7:3 (3.14 g), foi recromatografada em coluna ( $\phi$  3 cm) de sílica gel (80 g), empacotada com hexano e eluída com hexano e gradualmente enriquecida com acetato de etila e etanol. Foram coletadas 76 frações de 25 mL cada. As frações foram reunidas de acordo com semelhanças observadas por c.c.d.

A fração DW 23-24 36-52, eluída com hexano:acetato de etila 8:2 (1,40 g), foi recromatografada em coluna ( $\phi$  2,5 cm) de alumina (29 g), empacotada com hexano e eluída com hexano e gradualmente enriquecida com acetato de etila. Foram coletadas 57 frações de 20 mL cada. As frações foram reunidas de acordo com semelhanças observadas por c.c.d. Da fração DW 23-24 36-52 15-18, eluída com hexano:acetato de etila 7:3, isolou-se **DW-8.1** (15.7 mg). Da fração DW 23-24 36-52 19-25, eluída com hexano:acetato de etila 6:4, isolou-se **DW-8** (23.2 mg).

A fração DW 23-24 36-52 26-38, eluída com hexano:acetato de etila 2:8 (395 mg) foi recromatografada em coluna ( $\phi$  1,5 cm) de sílica gel (30 g), empacotada com hexano:Acetato de etila 7:3 e gradualmente enriquecida com acetato de etila. Foram coletadas 20 frações de 15 mL cada. As frações foram reunidas de acordo com semelhanças observadas por c.c.d. Da fração DW 23-24 36-52 26-38 8-9, eluída com hexano:acetato de etila 7:3, isolou-se **DW-8.1** numa mistura dos isômeros *cis* e *trans* (15 mg). Da fração DW 23-24 36-52 26-38 11-12, eluída com hexano:acetato de etila 8:2, isolou-se **DW-7** (69.7 mg).

A fração DW 25-29, eluída com hexano:acetato de etila 1:1 (7,19 g), foi recromatografada em coluna ( $\phi$  4 cm) de sílica gel (100 g), empacotada com hexano e eluída com hexano e gradualmente enriquecida com diclorometano, acetato de etila e etanol. Foram coletadas 108 frações de 25 mL cada. As frações foram reunidas de acordo com semelhanças observadas por c.c.d.

A fração DW 25-29 10-28, eluída com hexano:diclorometano 4:6 (1,95 g), foi recromatografada em coluna ( $\phi$  3 cm) de sílica gel (55 g), empacotada com hexano e eluída com hexano e gradualmente enriquecida com acetato de etila e metanol. Foram coletadas 60 frações de 25 mL. cada. As frações foram reunidas de acordo com semelhanças observadas por c.c.d.



A fração DW 25-29 10-28 16-22, eluída com hexano:acetato de etila 8:2 (550 mg), foi recromatografada em coluna ( $\phi$  1,5 cm) de sílica gel (25 g), empacotada com hexano e eluída com hexano e gradualmente enriquecida com acetona. Foram coletadas 52 frações de 10 mL cada. As frações foram reunidas de acordo com semelhanças observadas por c.c.d. Da fração DW 25-29 10-28 16-22 22-27, eluída com hexano:acetona 8,5:1;5, isolou-se **DW-4** (18 mg).

A fração DW 25-29 10-28 23-36, eluída com hexano:acetato de etila 2,5:6,5, (926 mg) foi recromatografada em coluna ( $\phi$  2,5 cm) de sílica gel (55 g), empacotada com hexano e eluída com hexano e gradualmente enriquecida com acetona. Foram coletadas 36 frações de 25 mL. cada. As frações foram reunidas de acordo com semelhanças observadas por c.c.d. Da fração DW 25-29 10-28 23-36 7-12 isolou-se o composto **DW-2** (362 mg).

A fração DW 25-29 29-47, eluída com hexano:acetato de etila 7:3 (1,24 g), foi recromatografada em coluna ( $\phi$  2,5 cm) de sílica gel (65 g), empacotada com hexano:acetato de etila 7:3 e gradualmente enriquecida com acetato de etila. Foram coletadas 85 frações de 15 mL cada. As frações foram reunidas de acordo com semelhanças observadas por c.c.d. Da fração DW 25-29 29-47 24-32, eluída com hexano:acetato de etila 6:4, isolou-se o composto **DW-5** (187 mg)

#### 4.3. MATERIAL VEGETAL *Drimys brasiliensis*

##### 4.3.1. COLETA

As cascas, caules e folhas da *Drimys brasiliensis* foram coletadas na cidade de Rancho Queimado, localizada no estado de Santa Catarina, no mês de dezembro de 1998. A identificação foi realizada pelos botânicos Jasper José Zanco (UNISUL) e Prof. Dr. Ademir Reis (UFSC) e teve como resultado a espécie *Drimys brasiliensis* Miers subsp. *Sylvatica* (Saint Hilaire) Ehrendofer L Gott sb. Uma exsicata encontra-se depositada no herbarium Barbosa Rodrigues (UNIVALI- Itajaí - SC), sob o código de VC Filho 010.

#### 4.3.2. OBTENÇÃO DO EXTRATO DAS CASCAS

1.850 Kg de cascas da *Drimys brasiliensis* foram secas em estufa a 40°C por dois dias, pulverizados em um triturador modelo LK-40 e extraídos por maceração com clorofórmio a temperatura ambiente por 10 dias. O extrato foi concentrado à pressão reduzida em evaporador rotativo, obtendo-se 30,2 g de extrato, que foi chamado de DB CHCl<sub>3</sub>. Rendimento 1.6%.

As cascas foram posteriormente maceradas com metanol por 10 dias. O metanol foi evaporado à pressão reduzida em evaporador rotativo, obtendo-se 60.62 g de extrato, que foi nomeado de DB MeOH. Rendimento 3.3%.

##### 4.3.2.1. Isolamento e purificação dos constituintes do extrato DB CHCl<sub>3</sub>

Os procedimentos utilizados para o fracionamento do extrato DB CHCl<sub>3</sub> podem ser visualizados na Fig.9.

O extrato clorofórmico chamado de DB CHCl<sub>3</sub> (23 g) foi submetido à cromatografia em coluna ( $\phi$  4,5 cm) de sílica gel (219 g), empacotada com hexano e eluída com hexano e gradualmente enriquecida com acetato de etila e etanol. Foram coletadas 75 frações de 100 mL cada. As frações foram reunidas de acordo com semelhanças observadas por c.c.d. Da fração DB CHCl<sub>3</sub> 28-32, eluída com hexano:acetato de etila 9:1, isolou-se um composto (3,112 g), que foi denominado **DB 1**.

A fração DB CHCl<sub>3</sub> 48-49, eluída com hexano:acetato de etila 6:4 (2,325 g), foi recromatografada em coluna ( $\phi$  3, 0 cm) de sílica gel (46 g), empacotada com hexano, eluída com hexano e gradualmente enriquecida com acetato de etila e etanol. Foram coletadas 51 frações de 25 mL cada. As frações foram reunidas de acordo com semelhanças observadas por c.c.d.

A fração DB CHCl<sub>3</sub> 48-49 14-18, eluída com hexano:acetato de etila 7.5:2.5 (198,4 mg), foi recromatografada em placa preparativa de sílica gel eluída com Hexano : Acetato de Etila 6:4. Foram detectadas 3 bandas ao se revelar a placa com anisaldeído, e estas foram raspadas e filtradas, chegando-se a 3 frações. Da



segunda fração isolou-se um composto (12 mg) denominado **DB-8**.

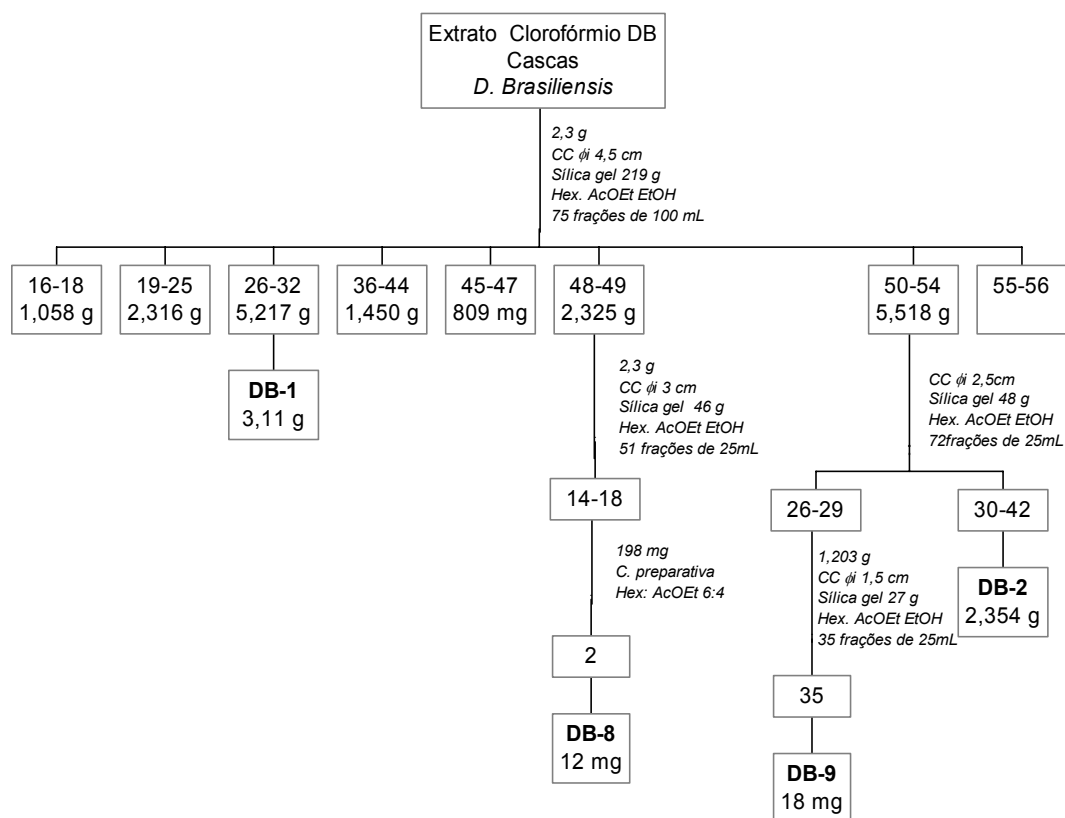


Figura 9 – Fracionamento de extrato  $\text{CHCl}_3$  das cascas de *D. brasiliensis*

A fração DB  $\text{CHCl}_3$  50-54, eluída com hexano:acetato 3:7 (5,518 g), foi recromatografada em coluna ( $\phi$  2,5 cm) de sílica gel (48 g), empacotada com hexano, eluída com hexano e gradualmente enriquecida com acetato de etila e etanol. Foram coletadas 72 frações de 25 mL cada. As frações foram reunidas de acordo com semelhanças observadas por c.c.d. Da fração DB  $\text{CHCl}_3$  50-54 30 - 42, eluída com hexano:acetato de etila 6:4, isolou-se um composto (3,354 g), denominado **DB-2**.

A fração DB  $\text{CHCl}_3$  50-54 26-29, eluída com hexano:acetato 7:3 (1.203 g), foi recromatografada em coluna ( $\phi$  1,5 cm) de alumina (27 g), empacotada com hexano, eluída com hexano e gradualmente enriquecida com acetato de etila e etanol. Foram coletadas 35 frações de 25 mL cada. As frações foram reunidas de acordo com semelhanças observadas por c.c.d. Da fração DB  $\text{CHCl}_3$  50-54 26-29 35, eluída com etanol, isolou-se um composto (17 mg), denominado **DB-9**.

#### 4.3.3. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DOS CAULES

700g de caule de *Drimys brasiliensis* foram secos em estufa a 40°C, moídos em um triturador modelo LK-40 e extraídos por maceração com 1 litro de clorofórmio, à temperatura ambiente, por 10 dias. O extrato foi concentrado à pressão reduzida em evaporador rotatório, obtendo-se 17.61 g do extrato, que foi chamado de DBC  $\text{CHCl}_3$ . Rendimento 2.5%

Posteriormente, o material foi deixado em maceração com metanol por 10 dias. O solvente foi evaporado à secura e obteve-se 14.76 g de extrato, que foi chamado de DBC MeOH. Rendimento 2.1%

##### 4.3.3.1. Isolamento e purificação dos constituintes do extrato DBC $\text{CHCl}_3$

Os procedimentos utilizados para o fracionamento do extrato DBC  $\text{CHCl}_3$  podem ser visualizados na Fig.10.

O extrato clorofórmico chamado de DBC  $\text{CHCl}_3$  (13.3 g) foi submetido à cromatografia em coluna ( $\phi$  3,5 cm) de sílica gel (100 g), empacotada com hexano e eluída com hexano e gradualmente enriquecida com diclorometano e etanol. Foram coletadas 75 frações de 100 ml cada. As frações foram reunidas de acordo com semelhanças observadas por c.c.d.

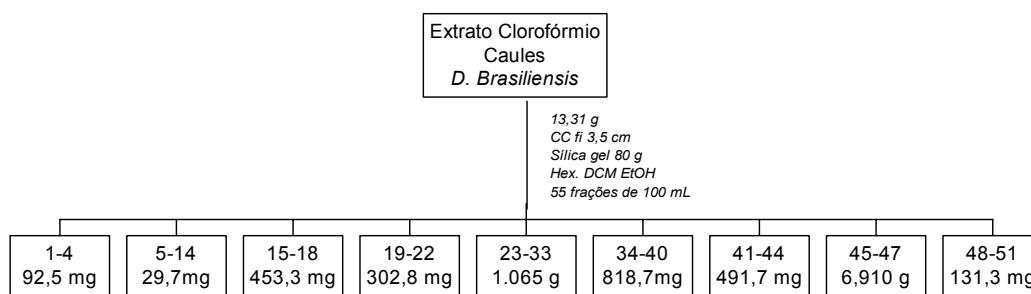


Figura. 10 - Fracionamento do extrato DBC  $\text{CHCl}_3$  do caules de *D. brasiliensis*

#### 4.3.4. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DAS FOLHAS

250 g de folhas da *Drimys brasiliensis* foram secas em estufa a 40°C por dois dias, triturados em um triturador modelo LK-40 e extraídas por maceração com 500 mL de clorofórmio a temperatura ambiente por 10 dias. O extrato foi concentrado à pressão reduzida em evaporador rotativo, obtendo-se 24,48 g do extrato, que foi chamado de DBF  $\text{CHCl}_3$ . Rendimento 9.8%

Posteriormente, o material foi deixado em maceração com metanol por 10 dias. O solvente foi evaporado à secura e obteve-se 10.56 g de extrato, que foi chamado de DBF MeOH. Rendimento 4.2%.

##### 4.3.4.1. Isolamento e purificação dos constituintes do extrato DBF $\text{CHCl}_3$

Os procedimentos utilizados para o fracionamento do extrato DBF  $\text{CHCl}_3$  podem ser visualizados na Fig.11.

O extrato clorofórmico chamado de DBF  $\text{CHCl}_3$  (17.1 g) foi submetido à cromatografia em coluna ( $\phi$ i 4,0 cm) de sílica gel (150 g), empacotada com hexano e eluída com hexano e gradualmente enriquecida com acetato de etila e etanol. Foram coletadas 55 frações de 100 mL cada. As frações foram reunidas de acordo com semelhanças observadas por c.c.d.

A fração DBF  $\text{CHCl}_3$  34, eluída com hexano:acetato 1:1 (1.134 g), foi recromatografada em coluna ( $\phi$  2 cm) de sílica gel (27 g), empacotada com hexano, eluída com hexano e gradualmente enriquecida com acetato de etila. Foram coletadas 35 frações de 35 mL cada. As frações foram reunidas de acordo com semelhanças observadas por c.c.d. Da fração DBF  $\text{CHCl}_3$  34 12-16, eluída com hexano:acetato 8:2, isolou-se um composto (157.4 mg), denominado **DBF-10**.

OBS. Só foram relatadas as colunas de onde se isolaram compostos, porém para todos os extratos, muitas outras colunas foram feitas, das quais não se obteve sucesso na purificação.

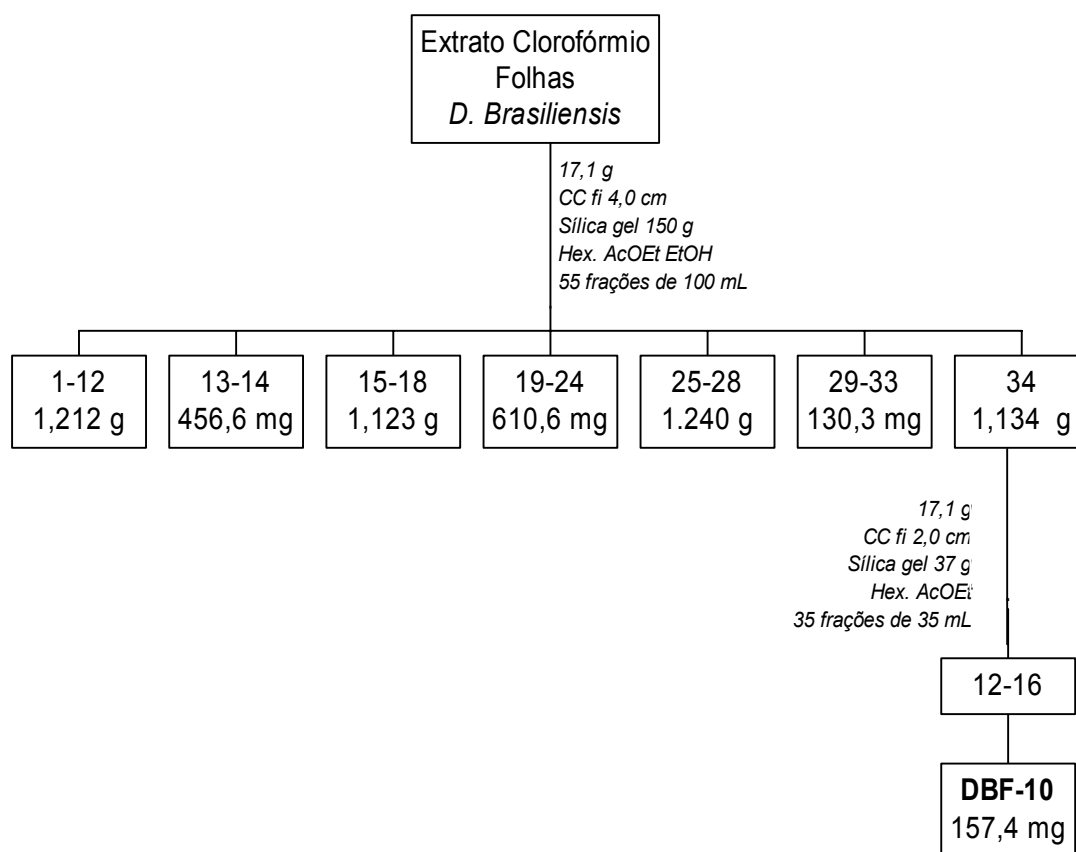


Figura 11 – Fracionamento do extrato DBF  $\text{CHCl}_3$  das folhas de *D. brasiliensis*

#### 4.4. MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS NO POLIGODIAL

##### 4.4.1. REAÇÕES DE REDUÇÃO DOS GRUPOS ALDEÍDICOS DO POLIGODIAL

A metodologia usada foi similar à descrita por Wenkert,<sup>93</sup> com pequenas modificações.

491 mmol de poligodial foram solubilizados em 6 mL de éter e adicionado 1473 mmol de NaBH<sub>4</sub>. A mistura foi agitada a temperatura ambiente por 1 h. O excesso de hidreto foi decomposto com uma solução de água/éter, filtrado e seco com MgSO<sub>4</sub>, posteriormente o solvente foi evaporado. À mistura reacional foi adicionado água (30 mL) e extraído com éter 3 X 15 mL. Na fase etérea foi adicionado MgSO<sub>4</sub> anidro, filtrado e evaporado o solvente.

O produto da reação foi purificado por cromatografia em coluna, obtendo-se 295 mmol do produto reduzido como óleo, denominado **DR-1**. Rendimento de 60%. Caracterizado por IV e RMN.

##### 4.4.2. OBTENÇÃO DA OXIMA DO POLIGODIAL

A metodologia usada foi similar à descrita por Vogel,<sup>94</sup> com pequenas modificações.

340 mmol de poligodial foram refluxados com 700 mmol de cloridrato de hidroxilamina, 5 mL de etanol e 1 mL de piridina, por 60 minutos. O etanol foi removido por evaporação em corrente de ar. Foi adicionado 5 mL de água ao resíduo frio e resfriado em banho de gelo com agitação. O solvente foi evaporado. O produto obtido foi cromatografado em coluna de onde purificou-se a dioxima, denominado **DR-2**. Rendimento 43%. Caracterizada por IV e RMN.

#### 4.4.3. OBTENÇÃO DO DERIVADO SEMICARBAZONA DO POLIGODIAL

A metodologia usada foi similar à descrita por Vogel,<sup>94</sup> com pequenas modificações.

980 mmol de cloridrato de semicarbazida, 1,85 mol de acetato de sódio foram solubilizados em 2 mL de água. Adicionou-se 487 mmol de poligodial e agitou-se a solução. Para eliminar a turbidez adicionou-se gotas de etanol e água. A solução foi deixada em repouso. Extraiu-se com eter 2 X 5 mL ocorrendo a formação de um precipitado denominado **DR-3**. Rendimento 35%. Caracterização por IV.

#### 4.4.4. OBTENÇÃO DO DERIVADO 2,4-DINITROFENIL-HIDRAZONA DO POLIGODIAL

A metodologia usada foi similar à descrita por Vogel,<sup>94</sup> com pequenas modificações.

Em erlenmeyer de 25 mL, adicionaram-se 1 mol de 2,4-dinitrofenil-hidrazina em 4 mL de metanol e 0,2 mL de ácido sulfúrico concentrado. Aqueceu-se até o sólido ficar solúvel e adicionou-se sobre uma solução de poligodial (300 mmol) solubilizado em 5 mL de eter-etílico, ocorrendo à formação de um precipitado. O mesmo foi filtrado e lavado com metanol, denominado **DR-4**. Rendimento 32%. Caracterização por RMN.

#### 4.4.5. REAÇÃO DO POLIGODIAL COM p-AMINOACETOFENONA

A metodologia usada foi similar à descrita por Vogel,<sup>94</sup> com pequenas modificações.

Em um balão de 25 mL, adicionou-se 428 mmol de poligodial solubilizado em 10 mL de etanol e adicionou-se 880 mmol de p-aminoacetofenona. Deixou-se em refluxo por 1 h. O solvente foi evaporado, o produto obtido foi cromatografado

em coluna purificando-se o derivado p-aminoacetofenona, denominado **DR-5**. Rendimento 26%, caracterizado por RMN.

#### 4.4.6. REAÇÃO DO POLIGODIAL COM METILAMINA

A metodologia foi similar à descrita por Cimino et al.,<sup>82</sup> com pequenas modificações.

Em um balão de 25 mL, de uma boca, adicionou-se 303 mmol de poligodial, 1 mL de acetato de etila e 0,5 mL de piridina. Adicionou-se 1 mol de metilamina. Deixou-se reagindo por 10 min. Extraiu-se com acetato de etila 2 X 5 mL, lavou-se com água, secou-se com MgSO<sub>4</sub>. Ocorreu a formação de um composto que se decompôs rapidamente.

#### 4.4.7. REAÇÃO DO POLIGODIAL COM ETILAMINA

A metodologia foi similar à descrita por Cimino et al.,<sup>82</sup> com pequenas modificações.

Em um balão de 25 mL, de uma boca, adicionou-se 303 mmol de poligodial, 1 mL de acetato de etila e 0,5 mL de piridina. Adicionou-se 1 mol de etilamina. Deixou-se reagindo por mais 10 min. Extraiu-se com acetato de etila 2 X 5 mL, lavou-se com água, secou-se com MgSO<sub>4</sub>. Ocorreu a formação de um composto que se decompôs rapidamente.

#### 4.4.8. REAÇÃO DE OXIDAÇÃO DOS GRUPOS ALDEÍDICOS DO POLIGODIAL

A metodologia usada foi similar à descrita por Campaigne,<sup>95</sup> com pequenas modificações.

250 mmol de nitrato de prata foi solubilizado em 4 mL de água e 6,5 mol de hidróxido de sódio foi solubilizado em 5 ml de água. As duas soluções foram misturadas sob agitação e deixado em banho de gelo. Adicionado 436 mmol de poligodial (solubilizado em 10 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) em pequenas porções com agitação. A suspensão de prata foi removida por filtração e lavada com várias porções de água quente e acidificado com HCl. O material resultante foi extraído com diclorometano (3 X 10 mL).

Após análise por c.c.d. verificou-se a formação de vários compostos, e havendo ainda a presença de poligodial. Não se conseguiu purificar nenhum composto.

#### 4.4.9. REAÇÃO DE BROMAÇÃO DO POLIGODIAL

A metodologia usada foi similar à descrita por Vogel,<sup>94</sup> com pequenas modificações.

300 mmol de poligodial foi solubilizado em 3 mL de  $\text{CCl}_4$ , e a esta solução adicionou-se vagarosamente 1 mL de uma solução de bromo- $\text{CCl}_4$  (0,2 mL de bromo em 5 mL de  $\text{CCl}_4$ ). Verificou-se o término da reação pela mudança de cor da solução. Posteriormente o solvente foi evaporado.

O produto obtido foi purificado por cromatografia em coluna de onde se purificou um composto denominado **DR-6**. Caracterização por RMN.

#### 4.4.10. REAÇÃO DE EPOXIDAÇÃO DA DUPLA LIGAÇÃO DO POLIGODIAL

A metodologia usada foi similar à descrita por Vogel,<sup>94</sup> com pequenas modificações.

O poligodial (436 mmol) foi solubilizado em 20 mL de diclorometano seco. Adicionou-se 1 mol de ácido meta-cloro-perbenzoico e manteve-se o meio reacional sob agitação a temperatura ambiente por 18 h. Ao material resultante foi adicionado carbonato de potássio, agitado e extraído com água (4 X 20 mL).



A fração de diclorometano foi evaporada e cromatografada, porém não se obteve nenhum composto puro.

#### 4.4.11. TRANSFORMAÇÃO DO POLIGODIAL PARA ISOPOLIGODIAL

Em um balão de uma boca, adicionou-se 100 mmol de poligodial solubilizado em 12 mL de etanol, a solução foi deixada sob refluxo durante 5 h. A cada hora de refluxo uma alíquota de 1 mL era retirada e analisada em CG.

Em um balão de uma boca, adicionou-se 100 mmol de poligodial solubilizado em 12 mL de benzeno, a solução foi deixada sob refluxo durante 5 h. A cada hora de refluxo uma alíquota de 1 mL era retirada e analisada em CG.

#### 4.5. ANÁLISE POR CG DOS ESTRATOS DB $\text{CHCl}_3$ DAS CASCAS, CAULES E FOLHAS DE *Drimys brasiliensis*

Uma fração dos extratos DB  $\text{CHCl}_3$  das cascas, caules e folhas foi previamente filtrada com clorofórmio, em coluna de sílica gel. Posteriormente preparou-se uma solução estoque de cada parte da planta (3000  $\mu\text{g/mL}$ ) usando clorofórmio como solvente. Foram tomadas alíquotas de 1,5  $\mu\text{L}$  de cada solução e analisadas por CG. Cada determinação foi feita em triplicata.

Condições CG – T. inicial 80°C aquecimento 8°C/min, T. final 280°C, isoterma 20 min. T. Interface – 280°C, T. injetor – 280°C. Detector de massas.

As condições adotadas foram as seguintes: fluxo de gases  $\text{N}_2$  e  $\text{H}_2$  30 ml/min, ar sintético 300 ml/min, coluna capilar de sílica fundida de 25 m LM-1, sensibilidade de  $2^1 \times 10^1$ .

## 4.6. ATIVIDADE BIOLÓGICA

### 4.6.1. ATIVIDADE ALELOPÁTICA

Os bioensaios de germinação e crescimento foram realizados no Depto de Botânica (Laboratório de Sementes Florestais - LASEF) sob a orientação da Prof<sup>a</sup>. Dra. Maíke Hering de Queiroz.

#### 4.6.1.1. Bioensaios de germinação e crescimento

As sementes de *Lactuca sativa* (alface) (dicotiledônea), variedade Grand Rapids (pureza 95% e germinação 85%), foram adquiridas comercialmente. As sementes de *Clusia parviflora*, foram obtidas no mês de fevereiro de 2000 no Campus da UFSC.

Para os bio-ensaios de germinação a metodologia utilizada foi descrita por Nishimura et al.<sup>96</sup> e para os bio-ensaios de crescimento utilizou-se a metodologia de Barnes et al.<sup>97</sup> ambas com modificações (Fig. 12).

Para os bioensaios, diluiu-se 1 mL do respectivo extrato em etanol nas concentrações de 250, 750, 1500 e 3000 ppm. Para os compostos, diluiu-se 1 mL do respectivo composto em etanol nas concentrações de  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-7}$  e  $10^{-9}$  M. Para os bioensaios de germinação, impregnou-se 1 mL de cada diluição do extrato aquoso em disco de papel filtro Whatman n<sup>o</sup> 1 (5,5 cm de diâmetro), previamente colocados em placas de Petri. Foi adicionado 1,5 mL de Tween 80 (100 µg/mL) em cada placa e deixado em repouso por uma noite. Cada disco recebeu 50 sementes da espécie teste *Lactuca sativa* com 4 repetições e 40 sementes da espécie *Clusia parviflora* com 4 repetições. Como controle, procedimento similar foi utilizado, porém sem adição do extrato. A germinação foi conduzida em germinador, com condições de luz e temperatura constantes ( $26^{\circ}\text{C} \pm 1$ ). Os discos de papel de filtro foram mantidos úmidos através de regas com água destilada. Foram feitas leituras diárias para avaliação do percentual de germinação. O experimento foi considerado concluído quando a germinação foi nula por duas contagens consecutivas. Como critério de germinação, foi estabelecido a protusão radicular. Para o bioensaio de crescimento, três dias

após a protusão radicular da espécie *Lactuca sativa* e 6 dias para *Clusia parviflora*, efetuou-se a medida do comprimento da radícula e hipocótilo, com papel milimetrado.

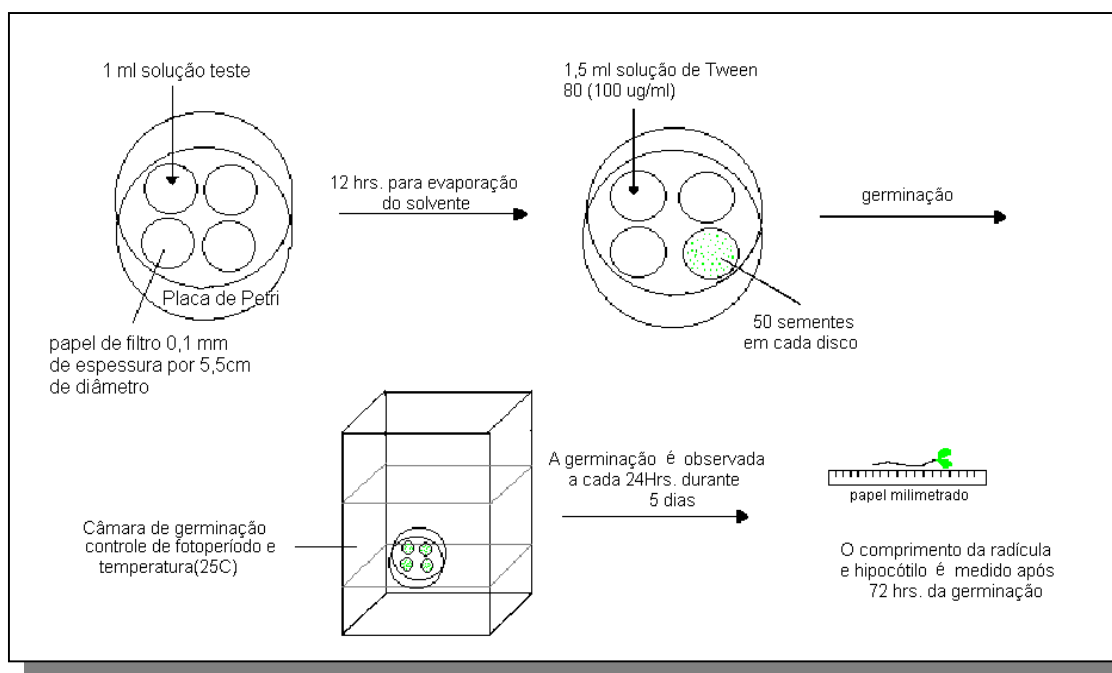


Figura 12- Esquema de um ensaio alelopático

#### 4.6.2. ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Os teste foram realizados na Faculdade de Farmácia e Bioquímica na Universidade Nacional de Rosário, Argentina, sob a orientação da Prof<sup>a</sup>. Dra. Susana Zacchino.

Utilizou-se para esta análise fungos de diversas espécies: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Criptococcus neoformans*, *Sacharomices serevisiae*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Mycrosporium canis*, *Mycrosporium gypseum*, *Epidermophyton floccusum*, *Trychophyton rubrum*, *Trychophyton mentagrophytes*.

Os compostos foram testados, por tais fungos, pelo método de diluição, a fim de se determinar a menor concentração de extratos ou compostos puros capazes

de inibir o crescimento destes patógenos, ou seja, a CIM (Concentração Inibitória Mínima), conforme ilustrado na Fig. 13.<sup>98</sup>

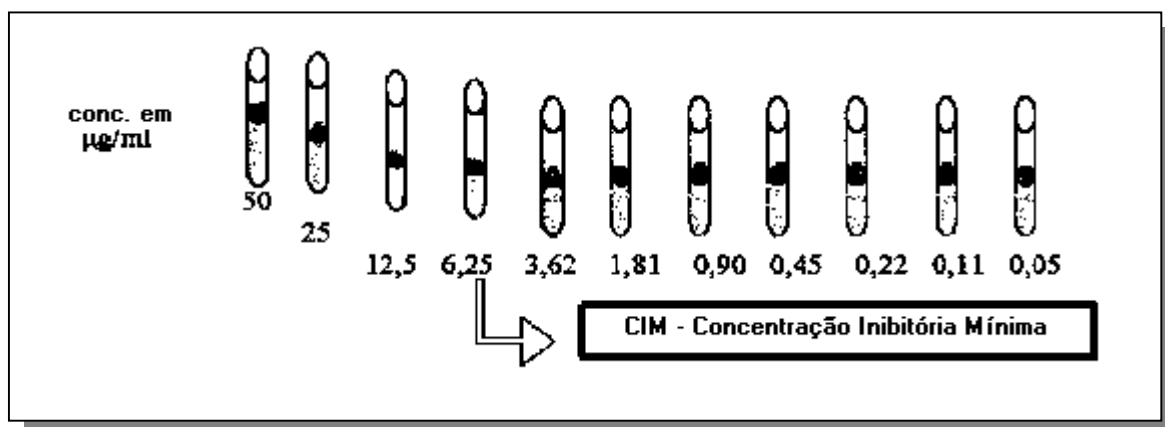


Figura 13 – Determinação da CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) pelo método de diluição

#### 4.6.3. ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA OU ANALGÉSICA

Os testes foram realizados no Depto de Farmacologia sob a orientação do prof. Dr. João Batista Calixto.

##### 4.6.3.1. *Modelo das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0,6% em camundongos*

O procedimento usado foi essencialmente similar ao descrito previamente.<sup>88,99</sup>

Camundongos “Suíços” machos (25-35 g) foram mantidos sob temperatura controlada ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e iluminação em ciclo de 12 horas com ração e água “ad libitum”. Os animais foram aclimatizados no laboratório por 1 hora antes de

começar os testes. A resposta nociceptiva foi induzida utilizando-se “Teste de contorções abdominais” com ácido acético (0,6%, via intraperitoneal), que promove contorções abdominais seguido de extensão de uma das patas posteriores. Os animais foram pré-tratados com os compostos isolados (1-60 mg/Kg) via intraperitoneal, 30 minutos antes da injeção do ácido acético. O grupo controle recebeu volume semelhante de uma solução salina (NaCl 0,9%, 10 mg/Kg). Após a injeção do ácido acético, os animais foram colocados em cilindros de vidro individuais, o número de contorções abdominais foi quantificado cumulativamente durante um período de 20 minutos. A atividade analgésica foi então determinada tomando-se como base a inibição do número de contorções abdominais dos animais pré-tratados com os compostos, comparados com o número de contorções abdominais dos animais controle (salina).

#### 4.6.3.2. *Modelo da dor induzida pela formalina*

O procedimento usado foi essencialmente similar ao descrito previamente.<sup>100</sup> Os animais (25-30 g) de mesma origem foram anestesiados com éter, exceto quando usados para analisar a primeira fase da dor induzida pela formalina, e 20 µl de formalina (2.5 % s.c) e salina foram injetadas sob a pata esquerda de cada animal. Os animais foram aclimatizados no laboratório por pelo menos 24 horas antes dos experimentos. Logo após, iniciou-se a observação da reação à dor, cronometrando-se o tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata, durante 30 minutos, considerando este período como indicativo de dor. Duas fases de sensibilidade são observadas neste modelo: a primeira fase aparece nos primeiros 5 minutos após a injeção da formalina (dor neurogênica); e a segunda fase entre 15 a 30 minutos após a injeção (dor inflamatória). Os animais foram tratados com salina 0.9 % (10 ml/kg, i.p.) ou com os compostos (drimanial e padrão) 60 min antes da injeção da formalina. Ao final do tempo de observação os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, e as patas foram cortadas e pesadas em balança analítica para quantificação do edema.

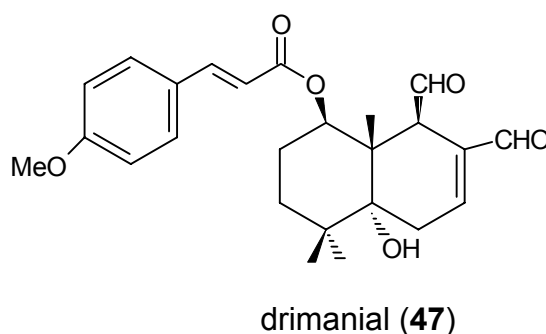
#### 4.6.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados para os testes de atividade antinociceptiva são apresentados como médias  $\pm$  S.E.M, exceto para os valores de  $DI_{50}$  (a dose de drogas que reduzem a resposta nociceptiva por 50% relativo ao valor do controle) as quais são reportadas como médias geométricas acompanhadas por seus respectivos limites de confiança de 95%. Os valores de  $DI_{50}$  foram determinados por regressão linear dos experimentos individuais usando a regressão linear do software GraphPad (GraphPad Software, CA). A significância estatística entre os grupos foi feita pela Análise de Variância ANOVA, seguida pelo Teste de Comparação Múltiplo Dunnett's. Valores de p menores que 0,05 ( $p < 0,05$ ) foram considerados como indicativo de significância.

Para a atividade alelopática a significância estatística entre os grupos foi realizada pela Análise de Variância ANOVA, seguida pelo Teste de Comparação Múltipla Tukey-Kramer. Valores de p menores que 0,05 ( $p < 0,05$ ) foram considerados como indicativo de significância.

### 5.2.7 COMPOSTO DW-2

O composto DW-2 foi isolado do extrato etanólico, da fração de clorofórmio como um sólido amorfo amarelo claro, Ponto de fusão 95-97<sup>0</sup>C,  $[\alpha]_D^{25} + 43.2^0$  (CHCl<sub>3</sub>; c0.926), análise elementar: C, 70,25; H, 7,15. A Sua estrutura foi determinada através das análises espectrométricas de IV, EM e RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e RMN 2D. Este composto está sendo relatado pela primeira vez e sua estrutura é derivada de 1-β-(p-metoxicinamil)-oligodial (**10**). Ele foi denominado drimanial (1-β-(p-metoxicinamil)-5-ol-9-β-drim-7-en—11,12-dial).<sup>101</sup>



O espectro no I.V. (Fig 41) apresenta bandas de deformação axial de O-H em 3482 cm<sup>-1</sup>, estiramento de grupos metila em 2960 cm<sup>-1</sup>, absorção de deformação axial C-H de grupamento aldeído em 2854 e 2732 cm<sup>-1</sup>, dublete referente ressonância de Fermi; deformação axial de C=O em 1710 e 1682 cm<sup>-1</sup>; deformação axial de C≡C em 1632 cm<sup>-1</sup> e deformação axial C-O em 1452 cm<sup>-1</sup>.

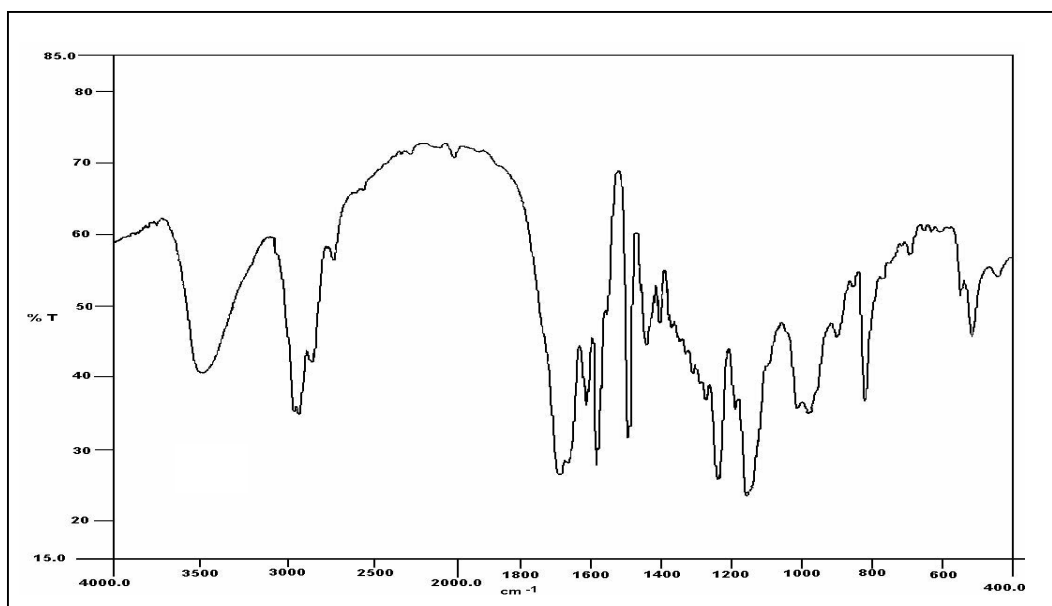


Figura 41 – Espectro no IV (pastilha de KBr) do DWC-2

As atribuições de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$  (Fig. 42, 43 e 44), estão dispostas na Tab. 10, e são o resultado do espectro de Hetcor (Fig. 45) para carbonos protonados e conectividades a longa distância para carbonos quaternários (Fig. 46).

A comparação dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  com o 1- $\beta$ -(p-metoxicinamil)-poligodol (**10**) revelou que ambos possuem sinais para dois grupos aldeídicos, uma ligação dupla tri-substituída e o resíduo p-metoxicinamil. O oxigênio adicional presente em DW-2 foi colocado no carbono C-5 como hidroxila, de acordo com o deslocamento paramagnético observado para os sinais C-4, C-6 e C-10 (efeito  $\alpha$ ), e o deslocamento diamagnético observado para os sinais em C-3, C-7 e C-9 (efeito  $\beta$ ). A designação correta da estrutura de DWC-2 foi suportada pelas conectividades a longa distância, conforme Tab. 11, em particular no espectro Hetcor LR (Fig. 46), a absorção em  $\delta$  78,1 designada como C-5 mostrou conectividade com Me-13. No experimento de Inept seletivo (Fig. 47), a irradiação seletiva para cada sinal metila ( $\delta$  1.23, 1.17 e 1.06) indicou a presença de um carbono oxigenado quaternário. Finalmente o espectro de NOE diferencial (Fig. 48) indicou que H-9, H-1, Me-13 e OH-5 estão todos em  $\alpha$  na molécula.



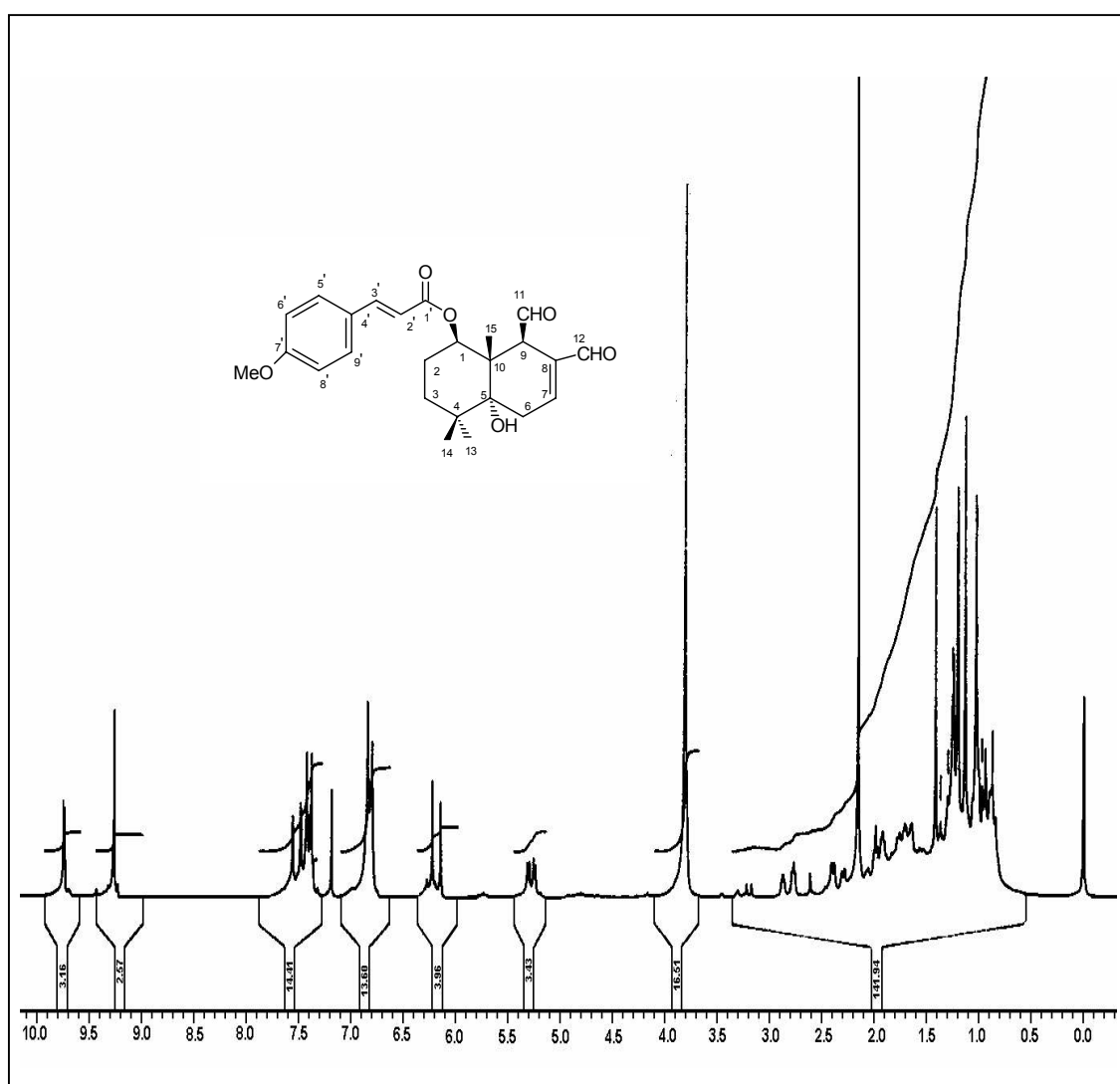
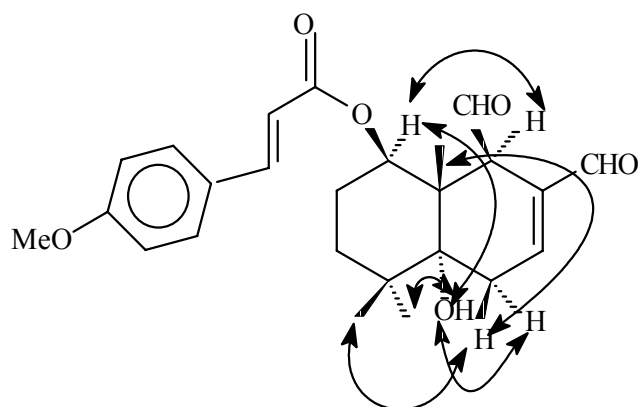


Figura 42 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ) do DW-2

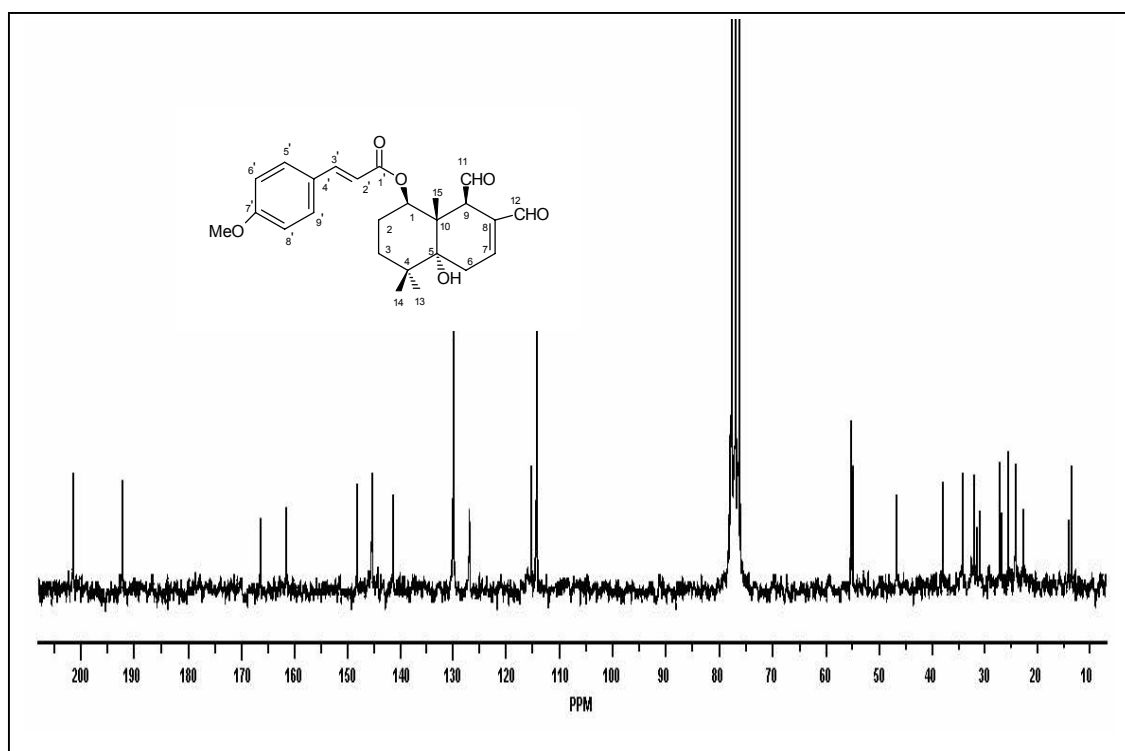


Figura 43 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ) do DW-2

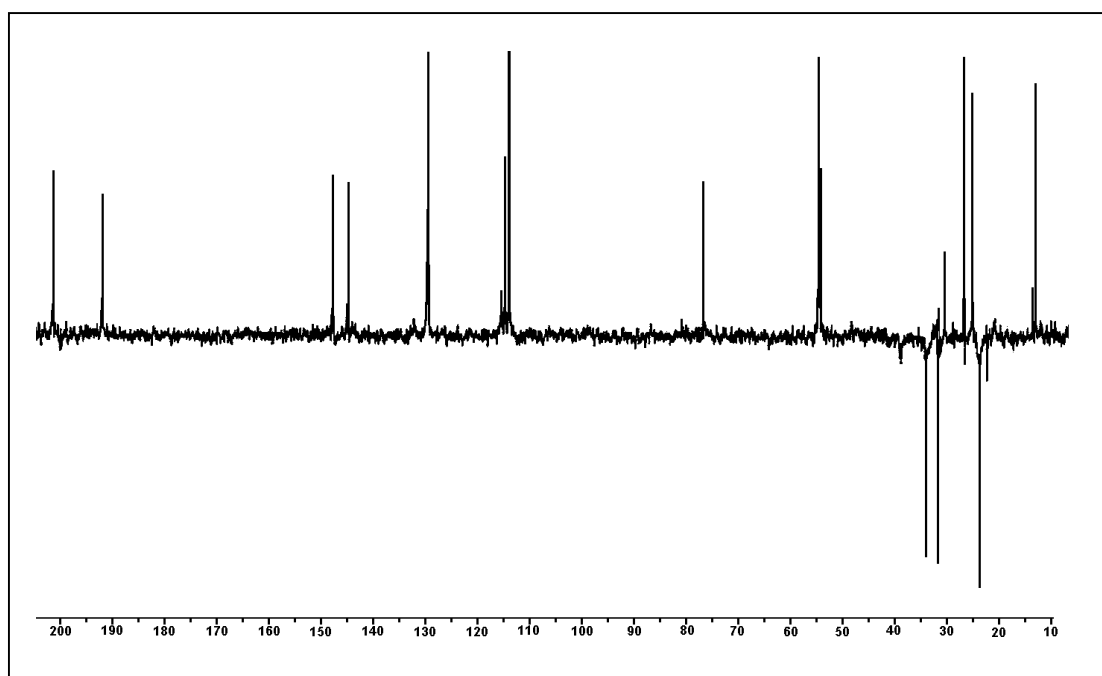


Figura 44 – Espectro de DEPT (50 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ) de DW-2

Tabela 10 - Valores de deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para DW-2 em acetona- $\text{d}_6$  e  $\text{CDCl}_3$

Posição	DW-2 $^1\text{H}$ $\delta$ mult. (J Hz)	DW-2 $^1\text{H}$ $\delta$ mult. (J Hz)	DW-2 $^{13}\text{C}$ $\delta$	DW-2 $^{13}\text{C}$ $\delta$
1	5,35 dd J = 11,6, 4,9	<b>5,49 dd J = 10,9, 4,0</b>	77,6	<b>77,1 / CH</b>
2	1,82 m	<b>1,80 / 1,70 m</b>	25,0	<b>24,0 / CH<sub>2</sub></b>
3	2,04; 1,27 m	<b>1,90 m</b>	35,1	<b>34,4 / CH<sub>2</sub></b>
4			38,9	<b>38,1 / C</b>
5			78,1	<b>78,1 / C</b>
6	2,93 dt; J = 2,0 2,52 dddd J = 5,5, 1,8	<b>2,80 / 2,40 m</b>	32,6	<b>32,1 / CH<sub>2</sub></b>
7	7,04 q J = 5,5	<b>6,88</b>	150,7	<b>148,2 / CH</b>
8			141,4	<b>141,3 / C</b>
9	3,73 br q J = 3,3	<b>3,84</b>	56,3	<b>55,1 / CH</b>
10			47,4	<b>46,6 / C</b>
11	9,78 d J = 3,3	<b>9,84 d J = 2,5</b>	201,2	<b>201,4 / CH</b>
12	9,36 s	<b>9,36 s</b>	193,2	<b>192,2 / CH</b>
13	1,06 s	<b>1,03 s</b>	27,7	<b>27,2 / CH<sub>3</sub></b>
14	1,23 s	<b>1,14 s</b>	25,6	<b>24,1 / CH<sub>3</sub></b>
15	1,17 s	<b>0,98 s</b>	13,5	<b>13,6 / CH<sub>3</sub></b>
1'			166,4	<b>166,4 / C</b>
2'	6,35 d J = 16,0	<b>6,24 d J = 16,0</b>	116,7	<b>115,7 / CH</b>
3'	7,60 d J = 16,0	<b>7,60 d J = 16,0</b>	145,2	<b>145,4 / CH</b>
4'			127,9	<b>126,9 / C</b>
5', 9'	7,64 d J = 8,9	<b>7,48 d J = 8,7</b>	130,8	<b>129,9 / CH</b>
6', 8'	6,99 d J = 8,9	<b>6,89 d j = 8,7</b>	115,2	<b>114,2 / CH</b>
7'			162,5	<b>161,5 / C</b>
OMe	3,86 s	<b>3,84 s</b>	55,6	<b>55,3 / CH<sub>3</sub></b>
OH	3,80 s	<b>3,84</b>		
	Acetona-d	<b><math>\text{CDCl}_3</math></b>	Acetona-d	<b><math>\text{CDCl}_3</math></b>
	300 MHz	<b>200 MHz</b>	300 MHz	<b>200 MHz</b>

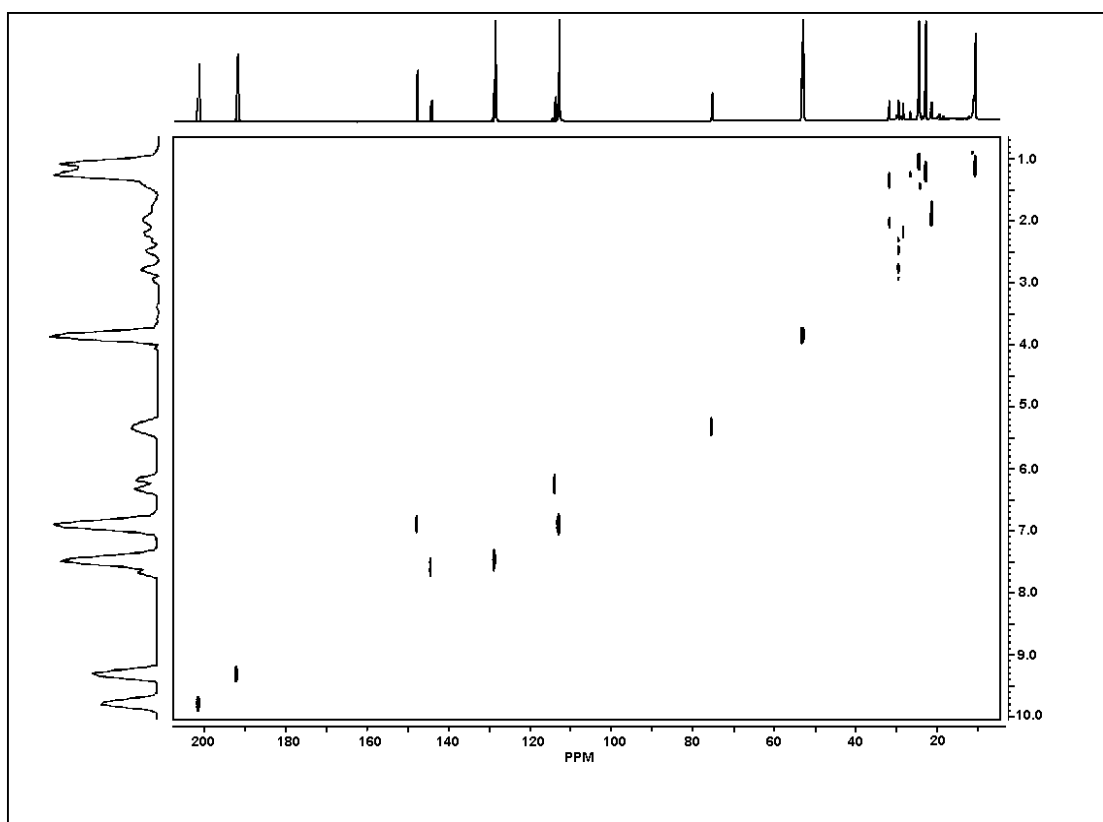


Figura 45 – Espectro de HETCOR (200 MHz/CDCl<sub>3</sub>) de DW-2

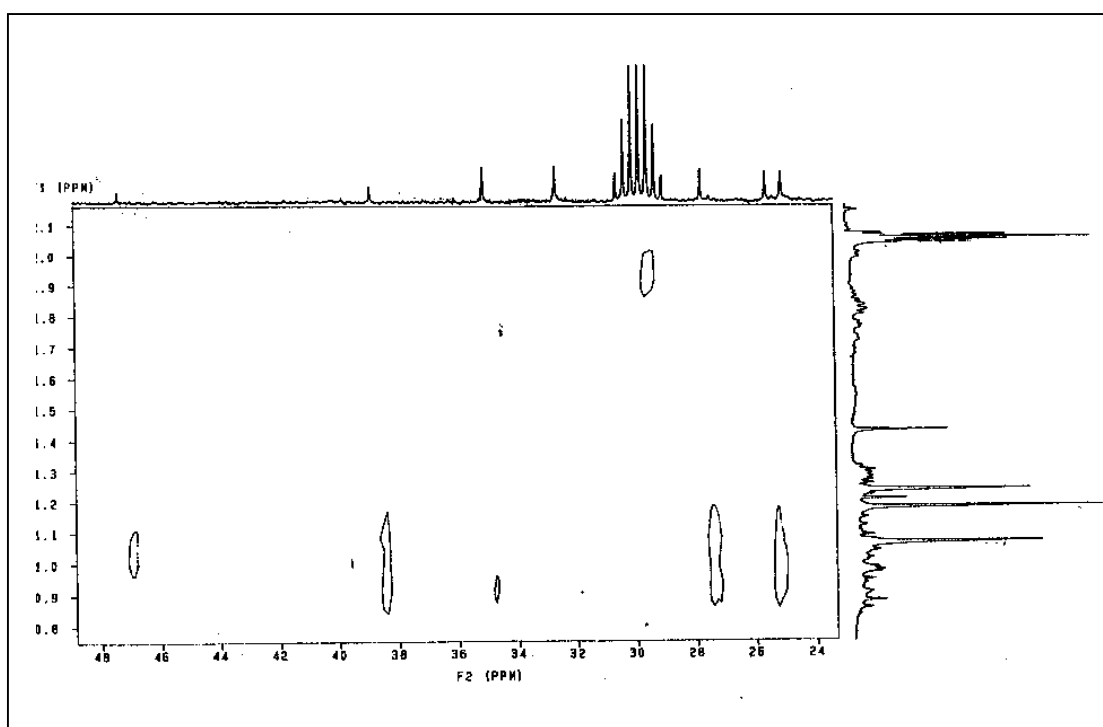


Figura 46a – Espectro de HETCOR LR (300 MHz / acetona-d<sub>6</sub>) de DW-2, 20 a 50 ppm

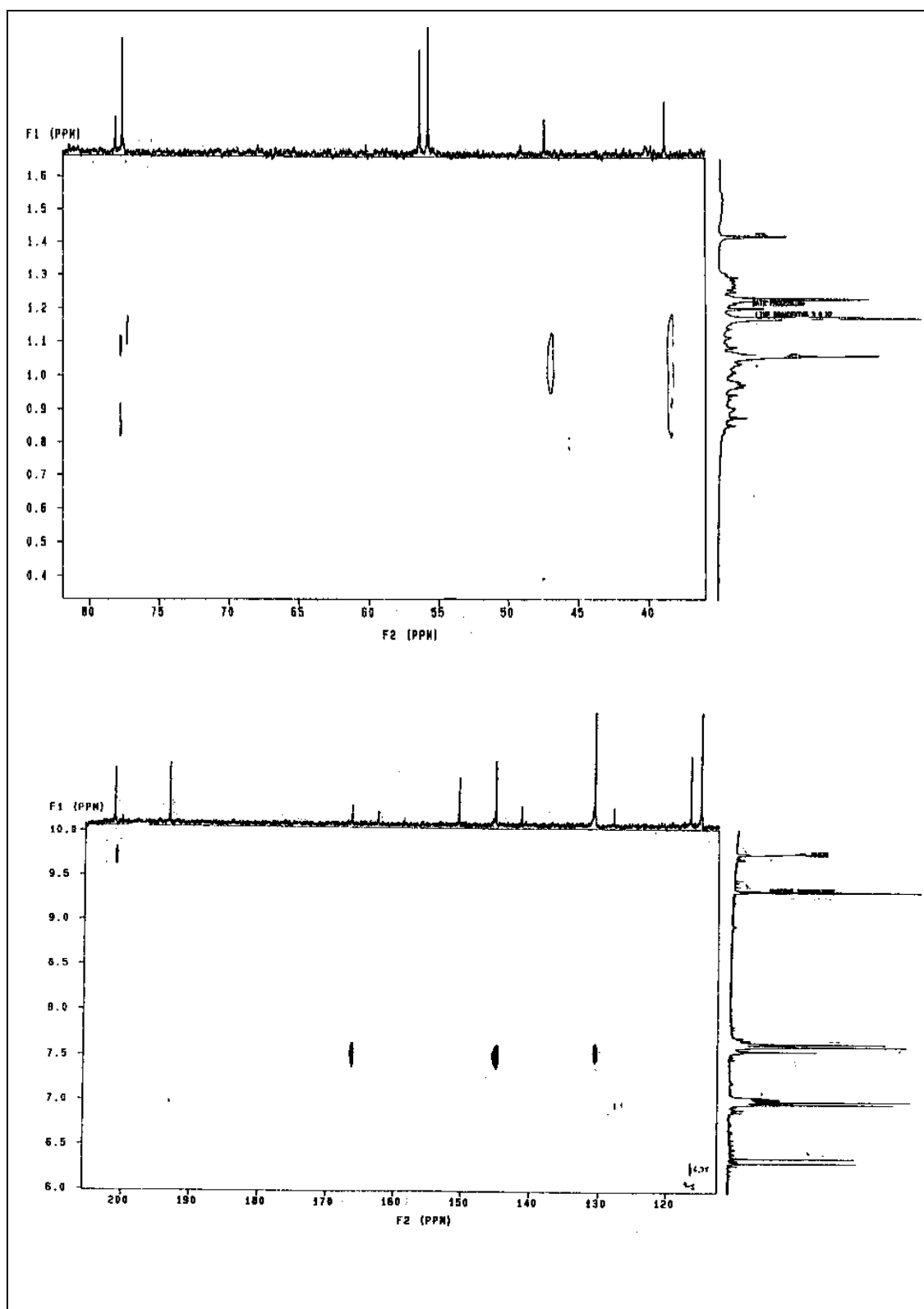


Figura 46 b – Espectro de HETCOR LR (300 MHz / acetona- $\text{d}_6$ ) de DW-2 35 a 80 ppm e 110 a 200 ppm

Tabela 11 – Conectividades a longa distância para DW-2.

C-H*		H-C+	
C-3	1,06 (Me-13)	H-1	166,4 (C-1'), 56,3 (C-9), 47, (C-10), 13,5 (Me-15)
C-4	1,6 0(Me-13) 1,23 (Me-14)	H <sub>2</sub> -6	150,7 (C-7), 141,4 (C-8) 47,4 (C-10), 78,1 (C-5)
C-5	1,06 (Me-13)	H-11	141,4 (C-8)
C-10	1,17 (Me-15)	H-12	56,3 (C-9)
C-7'	7,64 (H-5'/H-9')	Me-13	78,1 (C-5), 38,9 (C-4) 35,1 (C-3)
C-4'	6,99 (H-6'/H-8')	Me-14	78,1 (C-5), 38,9 (C-4) 35,1 (C-3)
		Me-15	78,1 (C-5), 77,6 (C1) 56,3 (C-9), 47,4 (C-10)

\* HETCOR Long Range

+ INEPT seletivo

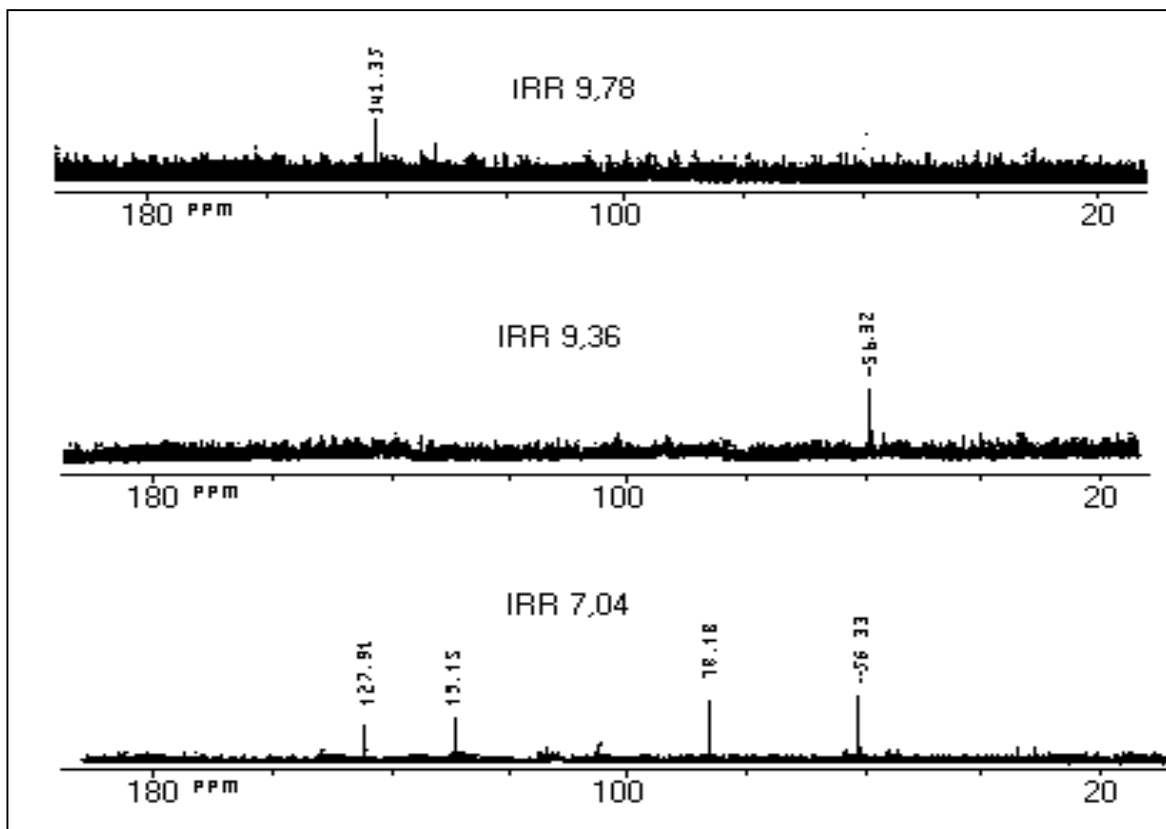


Figura 47 a – Espectro de INEPT seletivo de DW-2 IRR 9,78, 9,36 e 7,04 ppm

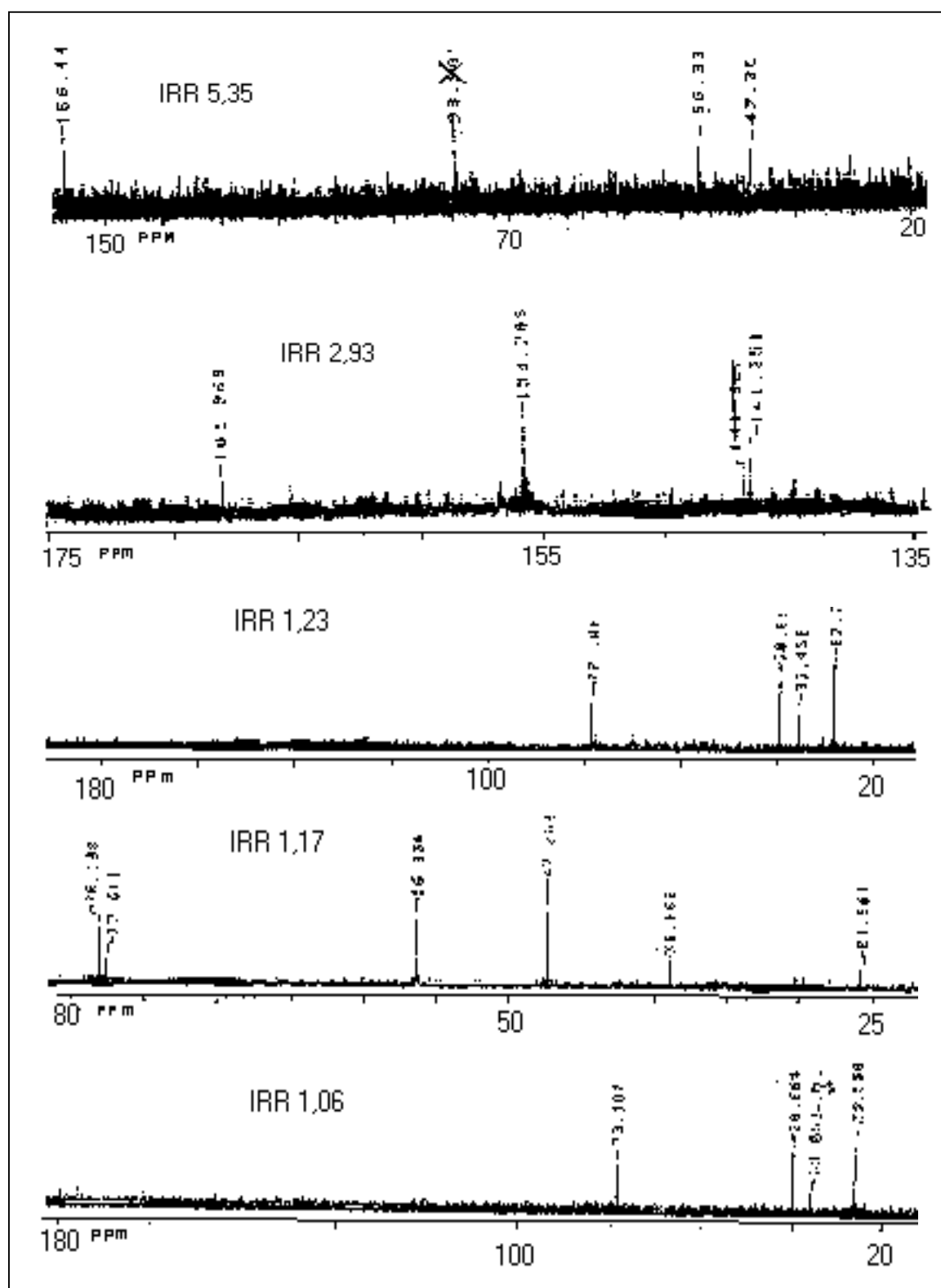


Figura 47 b – Espectro de INEPT seletivo de DW-2, IRR 5,35, 2,93, 1,23, 1,17 e 1,06 ppm

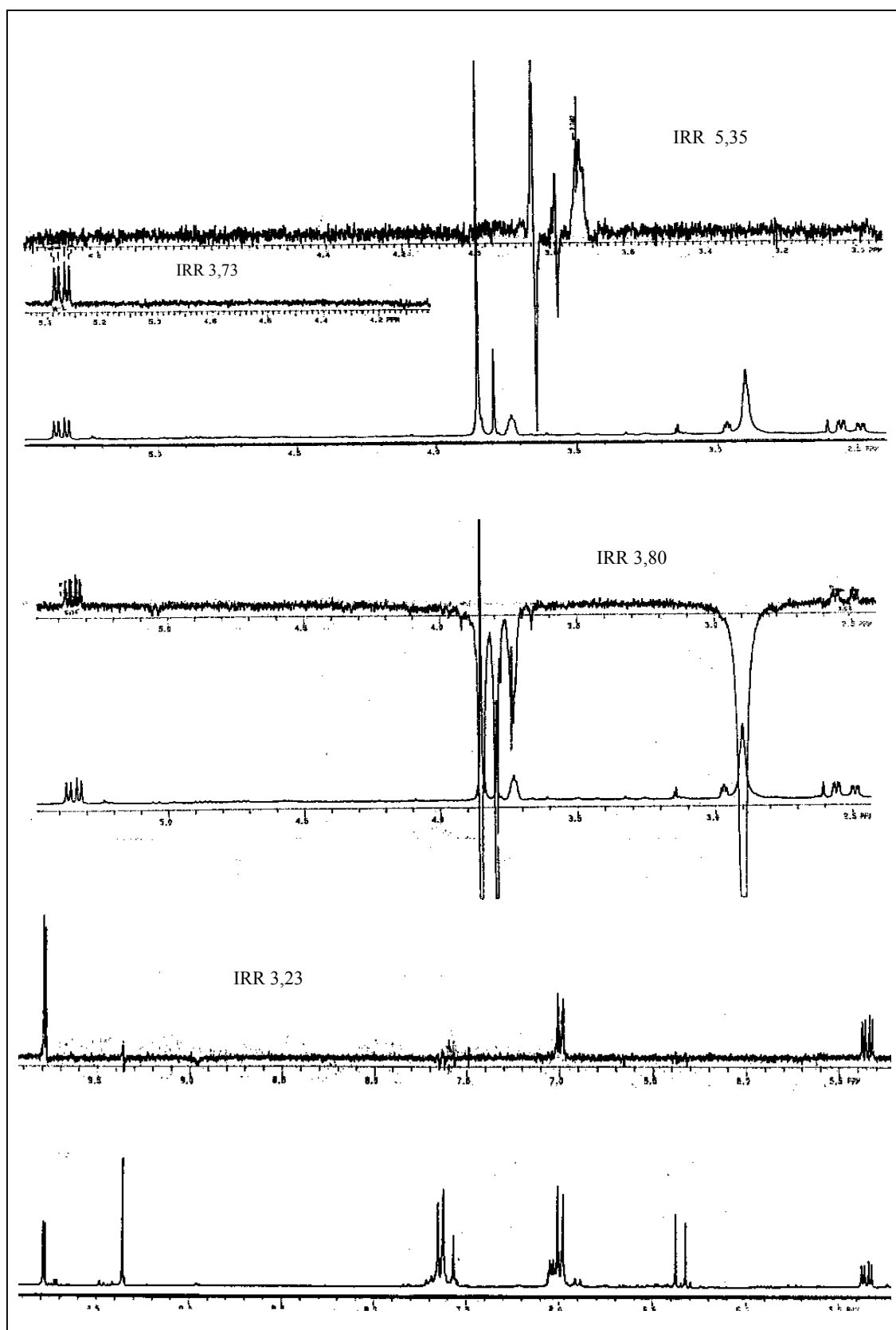


Figura 48 a – Espectro de NOE diferencial de DW-2, IRR 5,35, 3,80 e 3,23 ppm



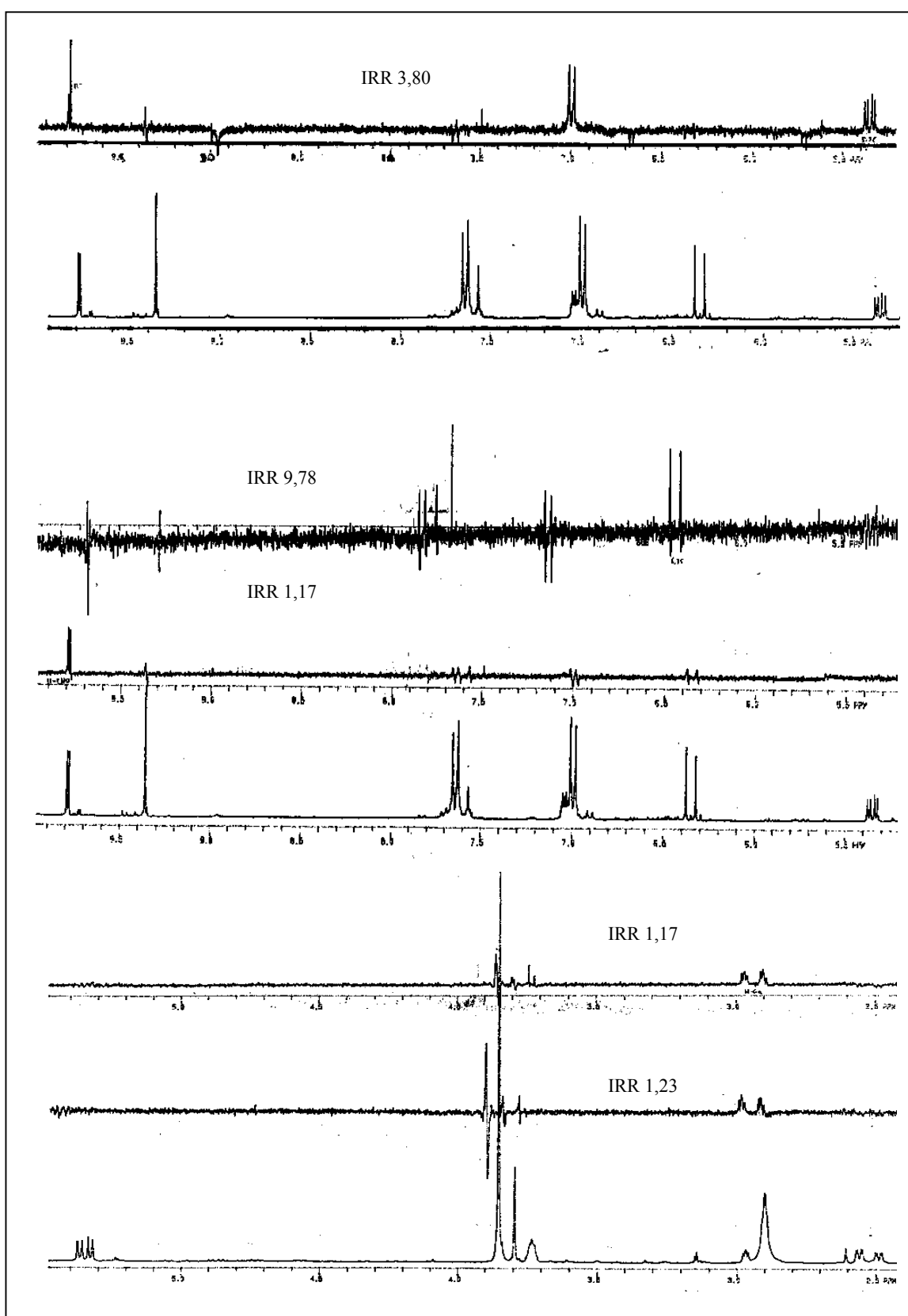


Figura 48 b – Espectro de NOE diferencial de DW-2, IRR 3,80, 9,78, 1,17 e 1,23 ppm

No espectro de massas (Fig. 49) observa-se o pico do íon molecular em  $m/z$  426 [ $M^+$ ] (DW-8 = 410), ou seja, 16 unidades de massa atômica a mais. Estes dados indicam que DW-2 possui um grupamento OH em relação à DW-8. Outros picos são observados em  $m/z$  397 [ $M^+ - CHO$ ], 380 [ $397 - OH$ ]. O pico base em  $m/z$  161 é resultante da quebra da ligação  $\alpha$  em relação ao grupo C=O do éster.

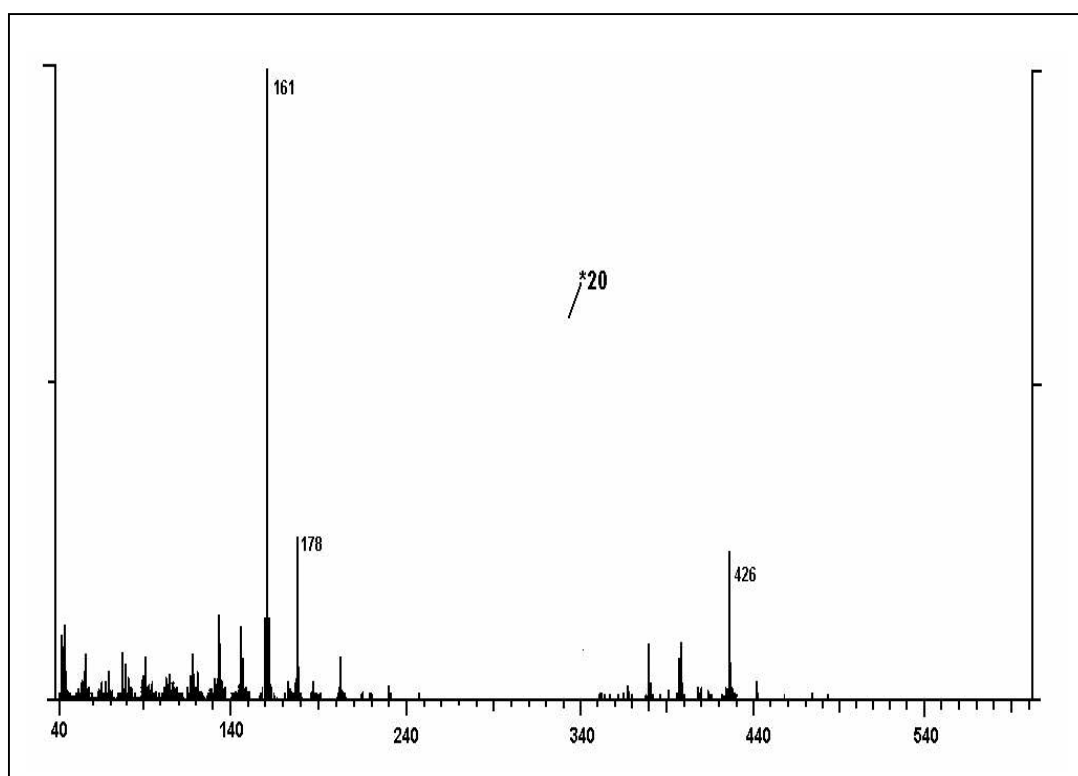
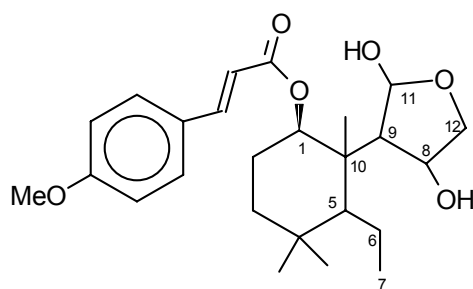


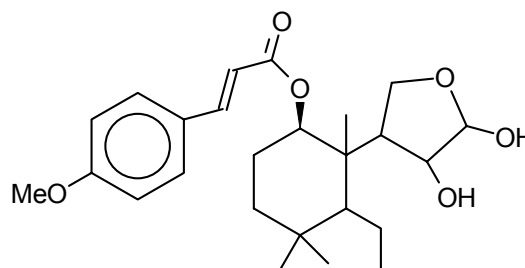
Figura 49 – Espectro de massas (70 eV) do DW-2

### 5.2.8. MISTURA DOS COMPOSTOS DW-7

A mistura dos compostos DW-7 foi isolada do extrato etanólico, da fração de clorofórmio como um óleo amarelo. A estrutura dos compostos foi determinada através das análises espectrométricas de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e RMN 2D. Até o momento não foram encontrados na literatura dados sobre ambos os compostos.



(49a)



(49b)

As atribuições de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ /APT (Fig. 50, 51), estão dispostas na Tab. 12 e são o resultado da análise dos espectros de RMN COSY (Fig. 52), HETCOR e INEPT seletivo (Fig. 53, Tab. 13).

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  pode ser observado o grupamento cinamila da mistura pelos sinais de  $\delta$  6,25 a 7,70, em  $\delta$  3,84 observa-se o sinal da metoxila. Este grupo está ligado ao carbono C-1 em  $\delta$  4,63, dd confirmado pelos valores obtidos das constantes de acoplamento  $J = 11,0$  e  $4,0$  Hz. A abertura do segundo anel em DW-7 pode ser verificada pelo triplete em  $\delta$  0,71(C-7) e ausência do próton olefínico que apareceria em torno de  $\delta$  7,00 como foi observado para os drimanos descritos anteriormente. Os deslocamentos químicos para os hidrogênios H-8, H-9, H-11 e H-12 da mistura foram deduzidos pelas correlações observadas no espectro de COSY (Fig. 52)

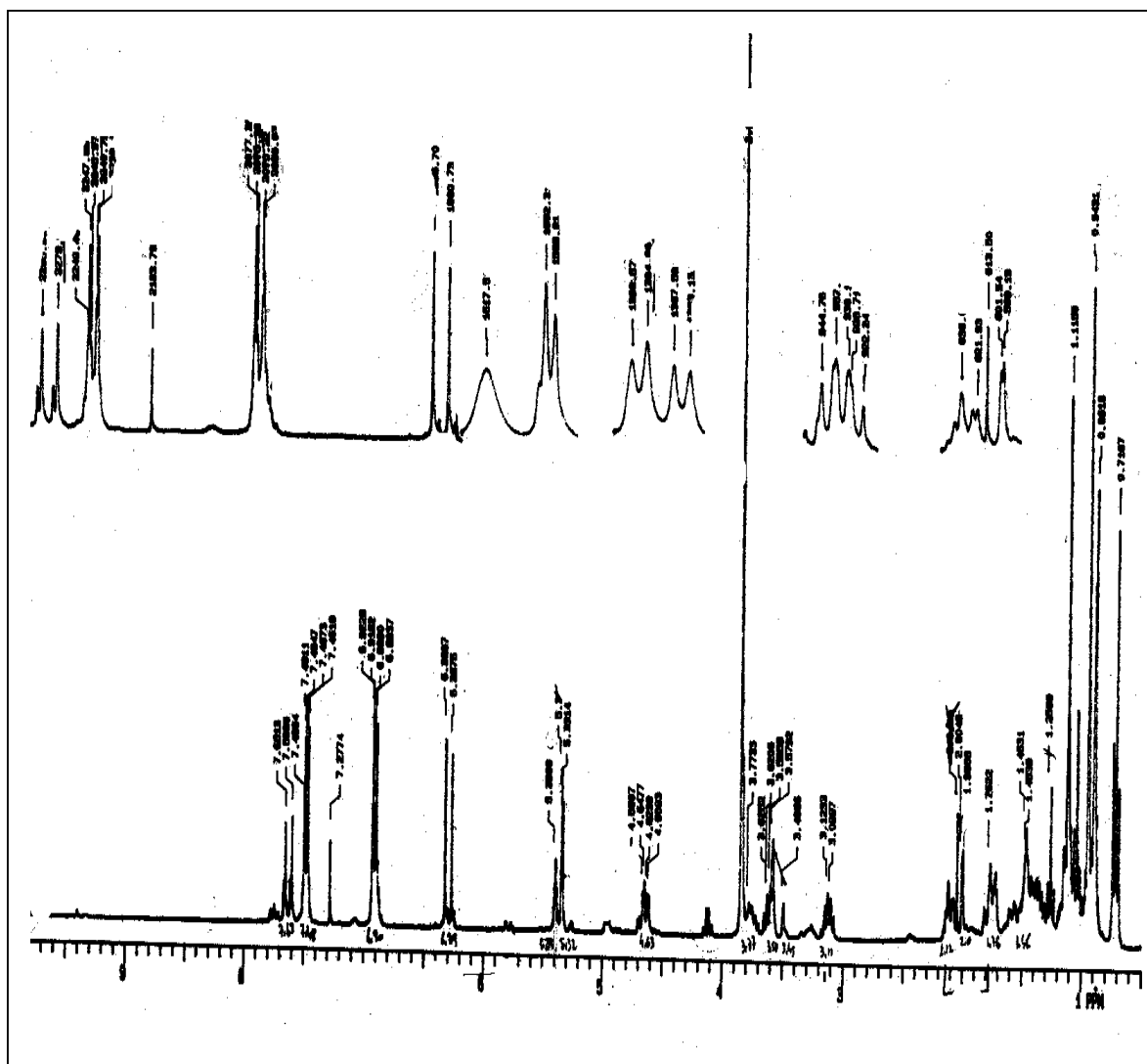


Figura 50 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de DW-7

Figura 51 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (75,5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de DW-7

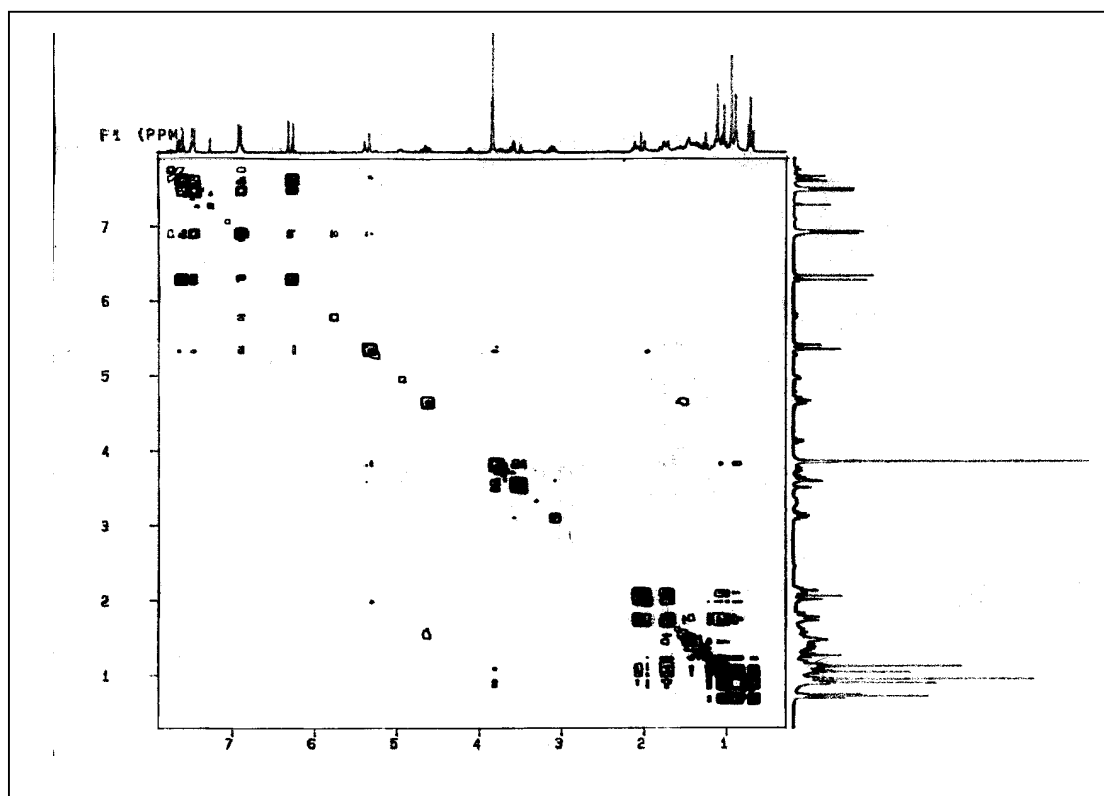


Figura 52 – Espectro de COSY (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de DW-7

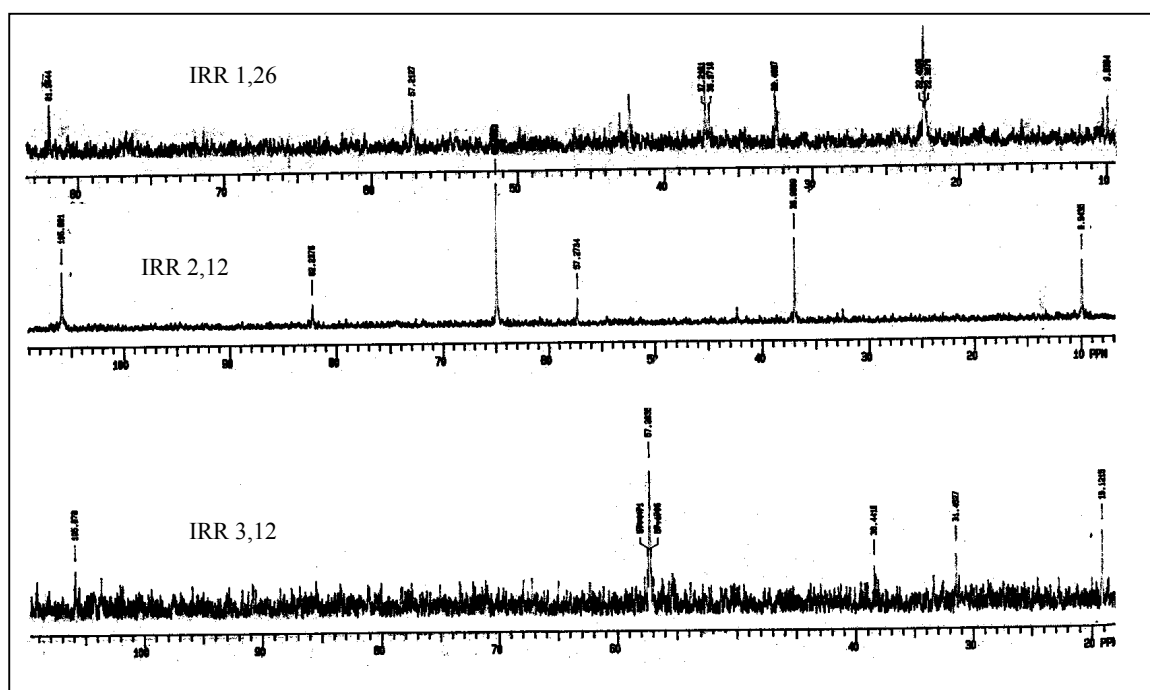


Figura 53 a – Espectro de INEPT seletivo de DW-7, IRR 1,26 , 2,12 3,12 ppm

Figura 53b – Espectro de INEPT seletivo de DW-7, IRR 5,34, 0,72, 1,04, 0,94, 0,90 4,96 ppm





Tabela 12 – Valores de deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  para DW-7 e DW-7Ac

	DW-7 $^1\text{H}$ $\delta$ mult. (J Hz)	DW-7 $^{13}\text{C}$ $\delta$ /APT	DW-7Ac $^1\text{H}$ $\delta$ mult. (J Hz)	DW-7Ac $^{13}\text{C}$ $\delta$ /APT
1 a	4,63 dd (J=11,0, 4,0)	82,0 / CH	4,63, dd, (J= 11,0 e 4,0)	81,1 / CH
b	4,67	82,2 / CH		82,0 / CH
2 a	1,76	24,2 / CH <sub>2</sub>	1,85*	24,2 / CH <sub>2</sub>
b	1,76	24,1 / CH <sub>2</sub>	1,69 <sup>#</sup>	24,3 / CH <sub>2</sub>
3 a/b	1,46	39,6 / CH <sub>2</sub>	1,47	39,4 / CH <sub>2</sub>
4 a/b		32,4 / C		32,4 / C
5 a	1,26	43,0 / CH	1,12**	43,8 / CH
b	1,24	42,6 / CH	1,17**	42,3 / CH
6 a	1,38	31,5 / CH <sub>2</sub>	1,42 <sup>#</sup>	31,4 / CH <sub>2</sub>
b	1,38	31,4 / CH <sub>2</sub>	1,43 <sup>#</sup>	31,5 / CH <sub>2</sub>
7 a	0,71 t (J = 2,3)	13,8 / CH <sub>3</sub>	0,73, t, (J = 7,4)	13,8 / CH <sub>3</sub>
b	0,71	13,8 / CH <sub>3</sub>	0,72, t,	13,7 / CH <sub>3</sub>
8 a	3,58, sl	54,4 / CH	3,45, sl	54,9 / CH
b	3,49	57,2 / CH	3,48	57,1 / CH
9 a	2,0 d (J = 2,4)	57,2 / CH	2,01 <sup>+</sup> , d, (J = 3,9)	57,5 / CH
b	2,12	55,6 / CH	2,16 <sup>+</sup> , d	55,5 / CH
10 a		37,2 / C		37,3 / C
b		37,0 / C		36,9 / C
11 a	5,34 d (J = 2,4)	103,7 / CH	5,43, d, (J = 3,1)	106,0 / CH
b	3,62	66,2 / CH <sub>2</sub>	5,35, d	106,7 / CH <sub>2</sub>
12 a	3,77 + 3,12	68,0 / CH <sub>2</sub>	3,68	68,6 / CH <sub>2</sub>
b	4,96, s	96,1 / CH	3,66	68,0 / CH
13 a	0,89, s	32,3 / CH <sub>3</sub>	0,90, s	32,3 / CH <sub>3</sub>
b	0,89, s	32,6 / CH <sub>3</sub>	0,90, S	32,3 / CH <sub>3</sub>
14 a	0,94 s	22,3 / CH <sub>3</sub>	0,96, s	22,1 / CH <sub>3</sub>
b	0,94, s	22,4 / CH <sub>3</sub>		22,4 / CH <sub>3</sub>
15 a	1,15 s	10,2 / CH <sub>3</sub>	1,14**, s	10,3 / CH <sub>3</sub>
b	1,04 s	9,9 / CH <sub>3</sub>	1,14**, s	10,1 / CH <sub>3</sub>
1' a/b		166,0 / C		165,8 / C
2' a	6,29 d (J = 16,0)	115,9 / CH	6,29, d, (J = 16,0)	116,0 / CH
b	6,29	115,6 / CH	6,29	115,8 / CH
3' a	7,62 d (J = 16,0)	144,2 / CH	7,63, d, (J = 16,0)	144,1 / CH
b	7,62	144,5 / CH		144,3 / CH
4' a/b		127,0 / C		127,0 / C
5'9' a	7,48 d (J = 8,8)	129,6 / CH	7,47, d (J = 8,7)	129,6 / CH
b	7,48	129,9 / CH	7,47	132,7 / CH
6'8' a	6,90 d (J = 8,8)	114,4 / CH	6,91, d, (J = 8,7)	114,4 / CH
b	6,90	113,4 / CH	6,91	113,6 / CH
7' a/b		161,5 / C		161,5 / C
OMe	3,84 s	55,4 / CH <sub>3</sub>	3,84, s	55,4 / CH <sub>3</sub>
a/b				
COO a				169,5 / C
b				170,5 / C
COMe			2,09 <sup>+</sup> , s	21,1 / CH <sub>3</sub>
A/b				
	CDCl <sub>3</sub> 300 MHz	CDCl <sub>3</sub> 75,5 MHz	CDCl <sub>3</sub> 300 MHz	CDCl <sub>3</sub> 75,5 MHz

\* \*\* # e + podem estar trocados

Tabela 13 – Conectividades a longa distância para DW-7 (49a) e DW-7Ac (50a)

H	DW-7	DW-7Ac
1	166 (C-1') <sup>3</sup> J 55,6 (C-9) <sup>3</sup> J 9,9 (C-15) <sup>3</sup> J	165,8 (c-1') <sup>3</sup> J, 57,5 (c-9) <sup>3</sup> J, 10,3 (C-15) <sup>3</sup> J
5	82,0 (C-1) <sup>3</sup> J 57,8 (C-9) <sup>4</sup> J 37,2/37(C-10) <sup>2</sup> J 32,5 (C-4) <sup>2</sup> J 22,4/22,3 (14) <sup>3</sup> J 9,9/10,2 (C-15) <sup>3</sup> J	
11	96,9/96,1 (C-12Hb)? 68,4/68,0 (C-12H2a) <sup>3</sup> J 66,3/64,9 (C-11H2b)? 37,0 (C-10) <sup>3</sup> J	68,7 (C-12) <sup>3</sup> J, 37,3 (C-10) <sup>3</sup> J
12H	103/105 (C-11a)? 64,9 (C-11b) <sup>3</sup> J 57,2 (C-8) <sup>3</sup> J 55,6 (C-9) <sup>2</sup> J	169,5(COO) <sup>2</sup> J, 170(COO) <sup>2</sup> J, 57,1 (C-8) <sup>2</sup> J
12H2	105 (C-11 <sup>a</sup> ) <sup>3</sup> J 57,2 (C-9) <sup>3</sup> J	54,9 (C-8) <sup>3</sup> J, 106,0 (C-11) <sup>3</sup> J, 54,9 (C-8) <sup>3</sup> J
13	55,6(C-9)? 39,6 (C-3) <sup>3</sup> J 37,0 (C-10)? 32,4 (C-4) <sup>2</sup> J 32,3 (C-13) <sup>3</sup> J	43,8 (C-5) <sup>3</sup> J, 39,4 (C-3) <sup>3</sup> J, 32,4 (C-4) <sup>2</sup> J, 22,1 (C-14) <sup>3</sup> J
14	55,6(C-9)? 39,6 (C-3) <sup>3</sup> J 37,0 (C-10)? 342,5 (C-4) <sup>2</sup> J 32,4 (C-13) <sup>3</sup> J	39,4 (C-3) <sup>3</sup> J, 37,3/36,9 (C-10) <sup>4</sup> J, 32,4 (C-4) <sup>2</sup> J,
15	82 (C-1) <sup>3</sup> J 55,6(C-9)? 42,4 (C-5) <sup>3</sup> J 37,0 (C-10) <sup>2</sup> J, 32,4 (C-13) <sup>3</sup> J	81,1 (C-1) <sup>3</sup> J, 57,9 (C-9) <sup>3</sup> J, 43,8 (C-5) <sup>3</sup> J, 37,3 (C-10) <sup>2</sup> J
Experimentos de INEPT seletivo		

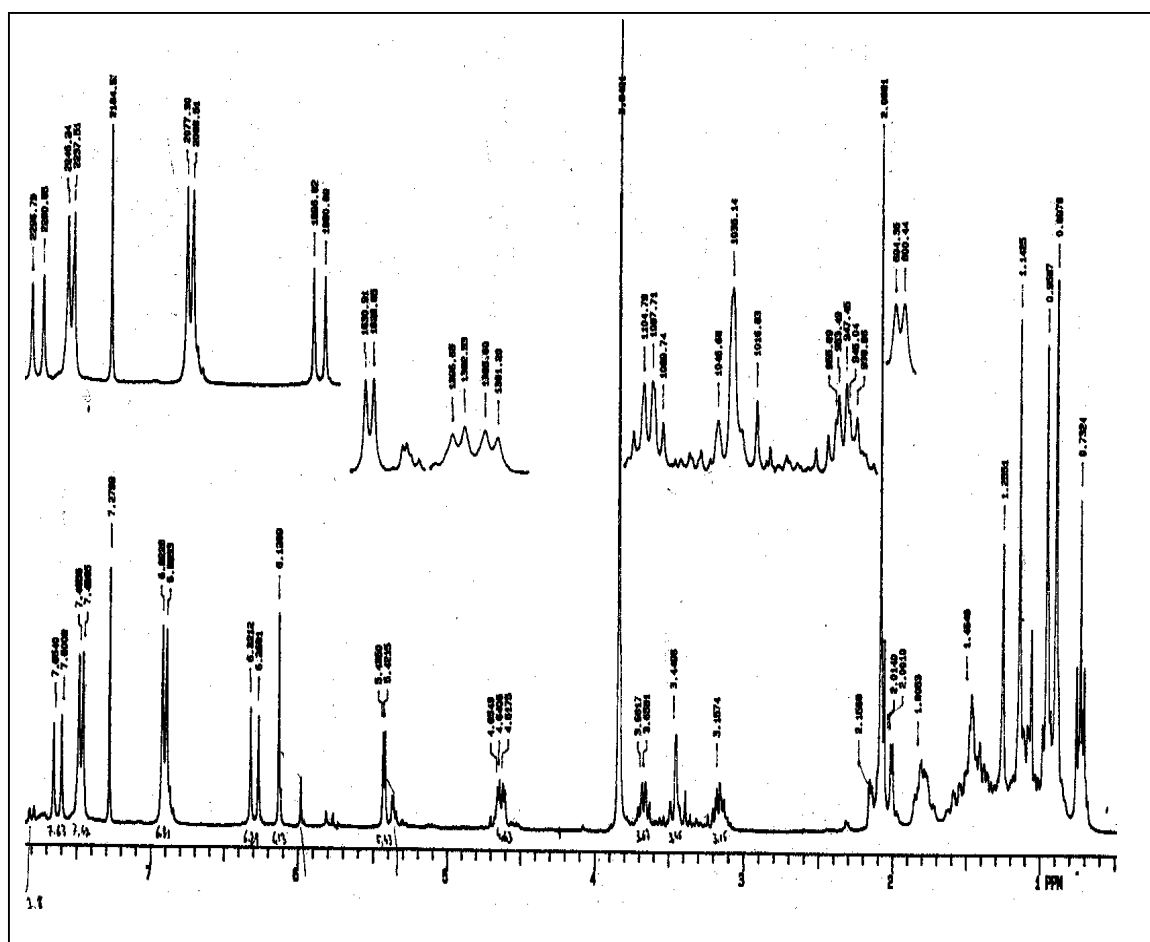


Figura 54 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de DW-7Ac



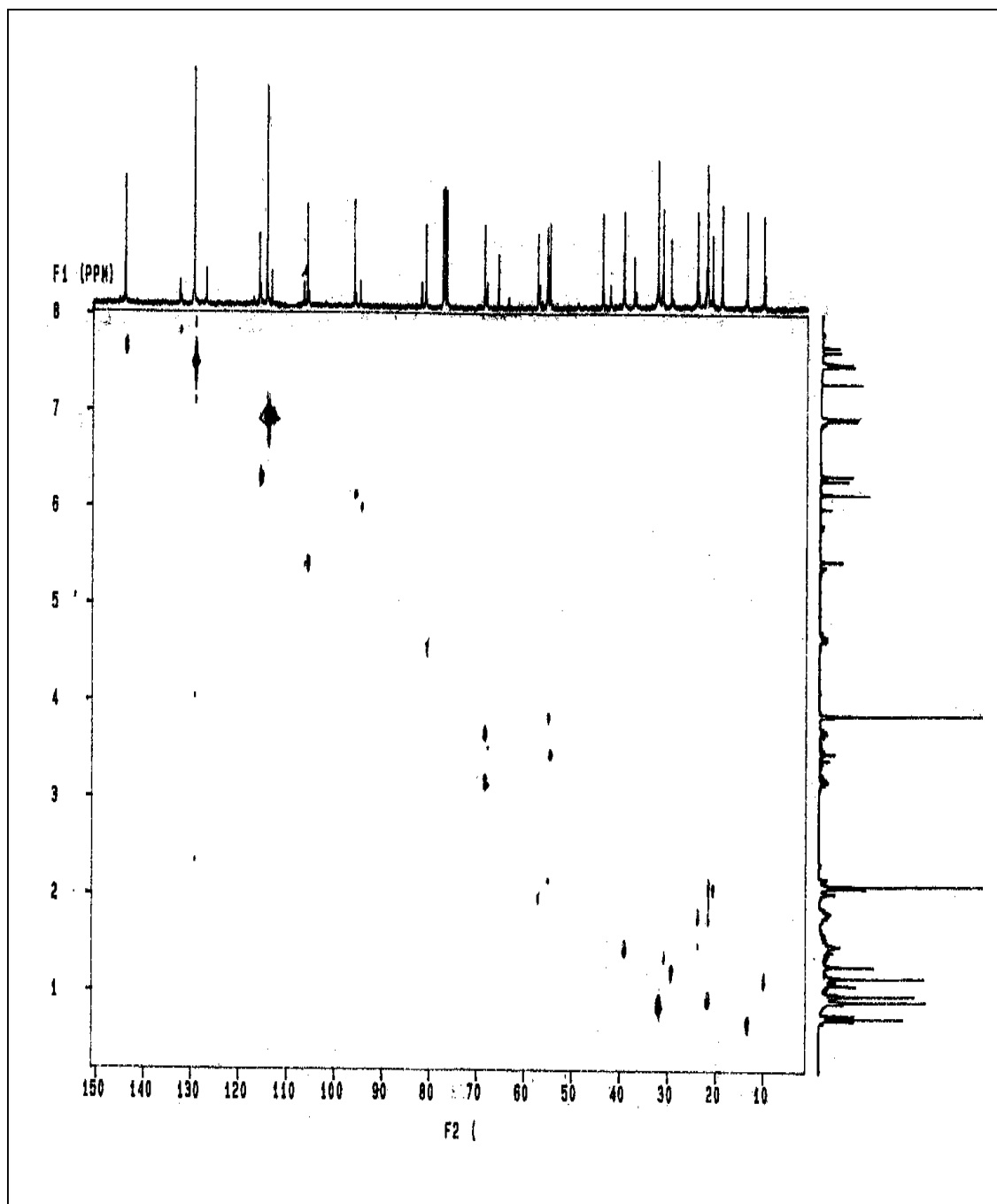


Figura 56 – Espectro de HETCOR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de DW-7Ac

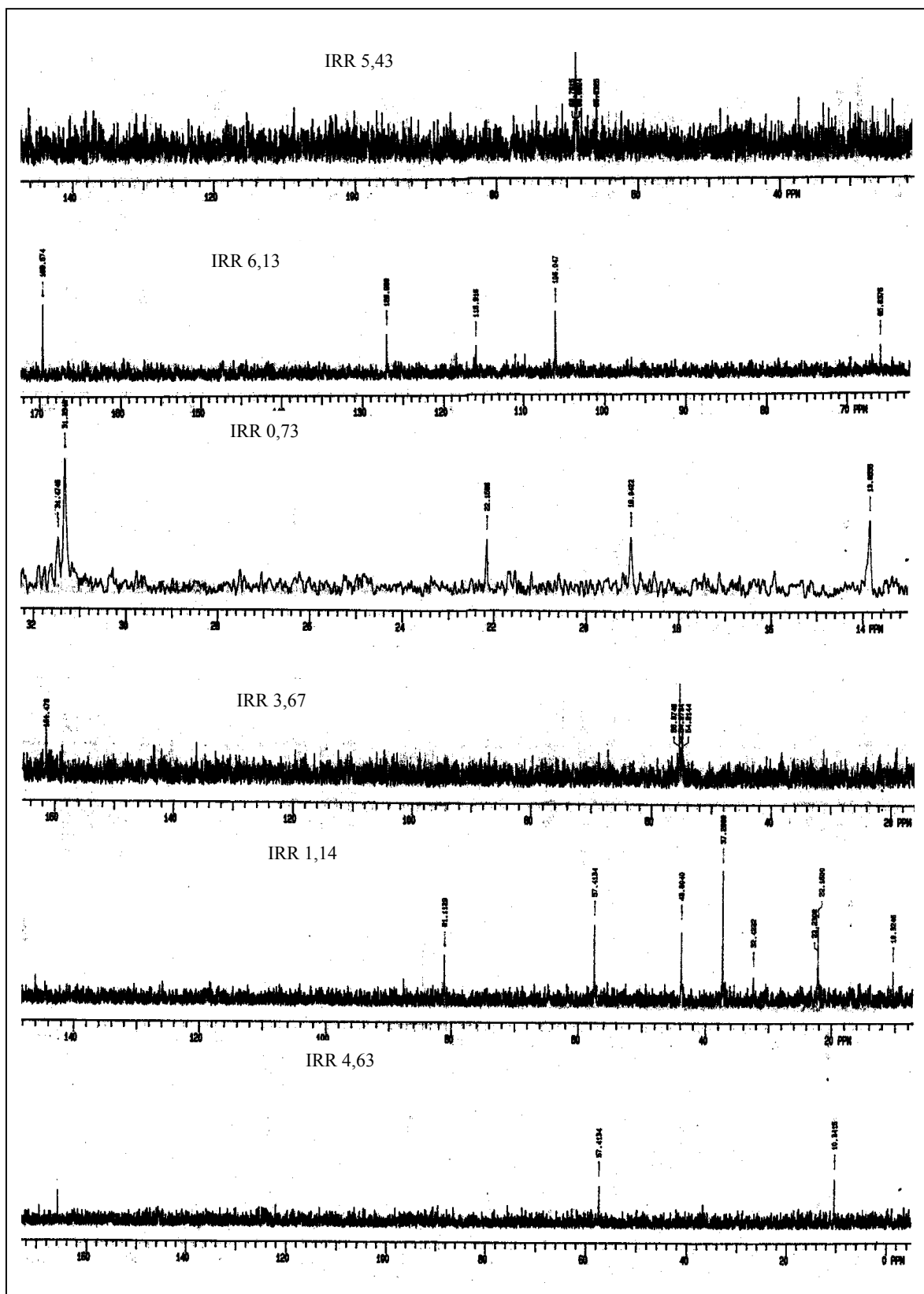
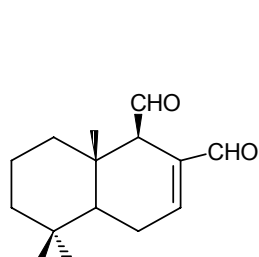


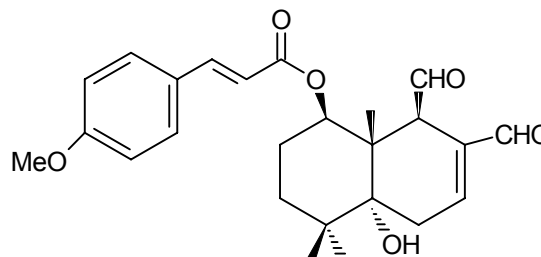
Figura 57 – Espectro de INEPT seletivo de DW-7Ac

### 5.3. IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS ISOLADOS DE *Drimys brasiliensis*

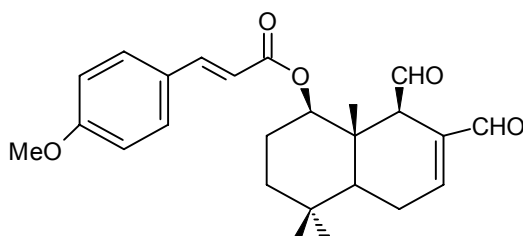
O estudo químico realizado com as cascas de *D. brasiliensis* levou ao isolamento dos sesquiterpenos drimanos **DB-1** poligodial (**8**), **DB-2** drimanal (**47**), **DB-8** 1-β-(p-metoxicinamil)-poligodial (**10**) e **DB-9** epifuegina (**51**). Dos compostos isolados, os compostos (**10**), (**47**) e (**51**) ainda não foram relatados para esta espécie, sendo que o (**47**) foi isolado pela primeira vez durante este trabalho da espécie *D. angustifolia*<sup>101</sup> e (**51**) ainda não havia sido descrito na literatura.



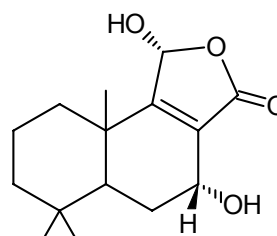
Poligodial (**8**)



drimanal (**47**)



1-β-(p-metoxicinamil) poligodial (**10**)

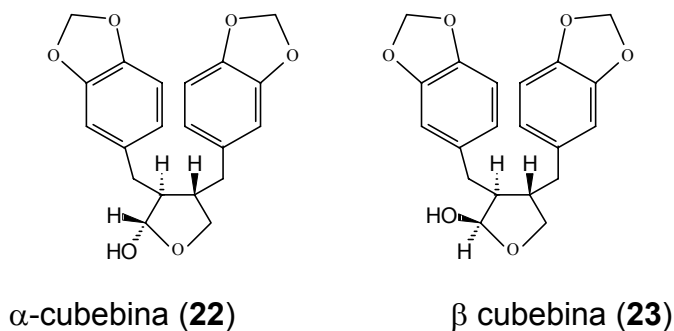


epifuegina (**51**)

OBS: Os compostos (**8**), (**10**) e (**47**) já foram descritos nas seções 5.2.1, 5.2.4 e 5.2.7, respectivamente.

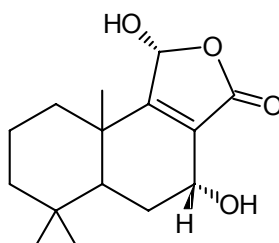
Dos caules foram isolados uma mistura de ácidos e álcoois graxos.

Das folhas foram isolados uma mistura de ácidos e álcoois graxos, bem como **DBF-10** que consiste de uma mistura de α e β cubebina (**22** e **23**). A mistura destas lignanas havia sido relatada das folhas de *D. angustifolia*.<sup>46</sup>



### 5.3.1. COMPOSTO DB-9

O composto DB-9 foi isolado da fração de clorofórmio do extrato DB  $\text{CHCl}_3$  da *D. brasiliensis*, após cromatografia em coluna, como um sólido marrom, solúvel em  $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{Me}_2\text{CO}$  e EtOH. A estrutura foi determinada através das análises espectroscópicas de IV, EM, RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  como epifuegina. Este composto ainda não havia sido descrito na literatura.



epifuegina (**51**)

O espectro no I.V. (Fig. 58) apresenta bandas de absorção em  $3418\text{ cm}^{-1}$  referente estiramento de OH,  $2930\text{ cm}^{-1}$  de grupos metila, deformação axial de  $\text{C}=\text{O}$  em  $1750\text{ cm}^{-1}$ , deformação axial de  $\text{C}=\text{C}$  em  $1634\text{ cm}^{-1}$  e deformação axial C-O em  $1180\text{ cm}^{-1}$ .



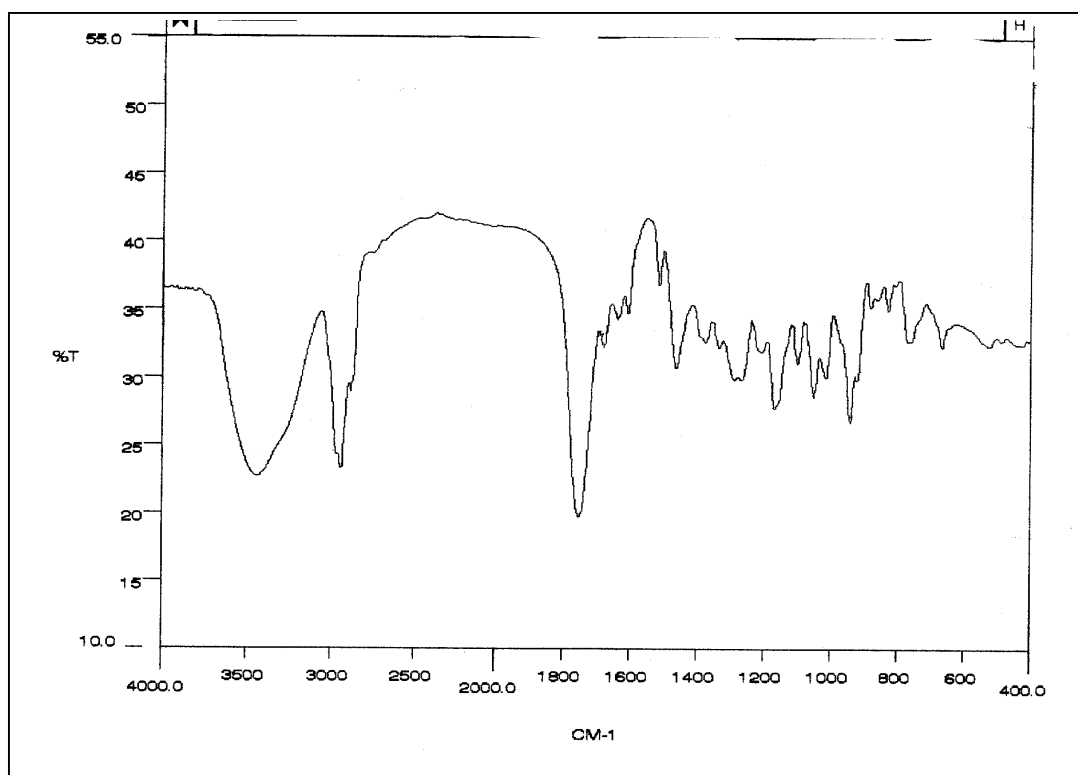


Figura 58 - Espectro no IV (pastilha de KBr) de DB-9

Os valores de deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ /APT (Fig. 59 e 60) indicam que o composto DB-9 é um sesquiterpeno (15 carbonos e predominância de sinais na região de 1 a 2 ppm). Pelo espectro de RMN  $^1\text{H}$  observam-se um singlete em  $\delta$  6,13, um dublete em  $\delta$  4,55, três singletes em  $\delta$  0,90, 0,98 e 1,16 e vários sinais na região de  $\delta$  1 a 2. No de RMN  $^{13}\text{C}$ /APT sinais referentes a 3  $\text{CH}_3$ , 4  $\text{CH}_2$ , 3  $\text{CH}$  e 5  $\text{C}$ . Os valores obtidos foram comparados com os encontrados na literatura, os quais se mostraram muito parecidos aos da fuegina (**19**). Na Tab. 14 estão apresentados os valores de deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  obtidos para DB-9 e dados da literatura para fuegina.<sup>104</sup> Os valores obtidos são o resultado da análise dos espectros de RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HETCOR e HETCOR LR para os carbonos protonados (Fig. 61 e 62).

Existem diferenças significativas quando comparado os valores de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de DB-9 com os da fuegina para os carbonos C-5 ( $\delta$  45,9 para  $\delta$  51,1) e C-7 ( $\delta$  60,1 para  $\delta$  64,9), sugerindo uma mudança na estereoquímica de H-7 para DB-9, 7-OH axial ( $\alpha$ ) e 7-H equatorial ( $\beta$ ), este composto foi denominado epifuegina. A presença do anel furano pode ser observada pelo sinal em  $\delta$  6,14.

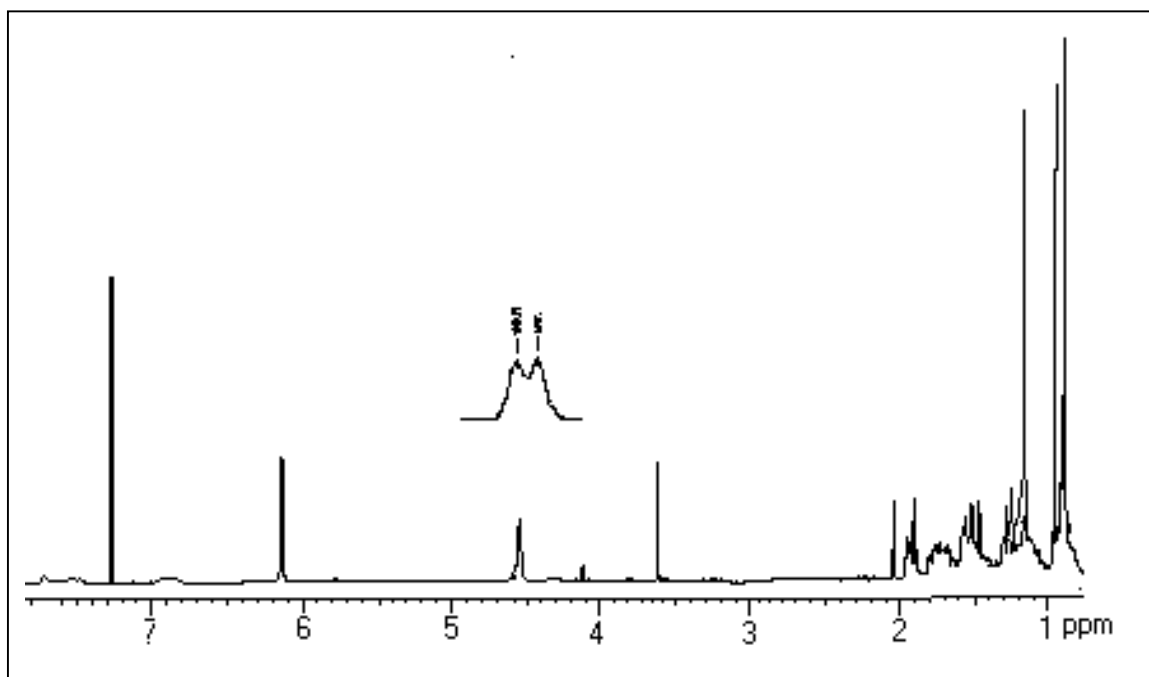


Figura 59 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de DB-9

Tabela 14 – Valores de deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para DB-9 e dados da literatura para fuegina<sup>104</sup>

Posição	DB-9 $^1\text{H}$ $\delta$ mult.	DB-9 $^{13}\text{C}$ $\delta$ / acoplado	Fuegina <sup>104</sup> $^1\text{H}$ $\delta$ mult. (J Hz)	Fuegina <sup>104</sup> $^{13}\text{C}$ $\delta$ / DEPT
1	1,92	34,6		34,8
2	1,55	18,2		18,0
3	1,49	41,4		41,2
4		32,9		33,1
5	1,55	45,9		51,1
6	1,72	27,7		27,6
7	4,54	60,1	4,54 m	64,9
8		127,9		128,5
9		171,4		170,5
10		37,6		37,9
11	6,14	97,7	6,05 d J = 1,4	97,8
12		171,7		171,4
13	0,90	33,0	0,90	32,5
14	0,96*	21,5	0,90	21,5
15	1,17*	21,5	1,29	19,8
	300 MHz $\text{CDCl}_3$	75,5 MHz $\text{CDCl}_3$	300 MHz $\text{CDCl}_3$	75,5 MHz $\text{CDCl}_3$

\* Os valores podem estar trocados

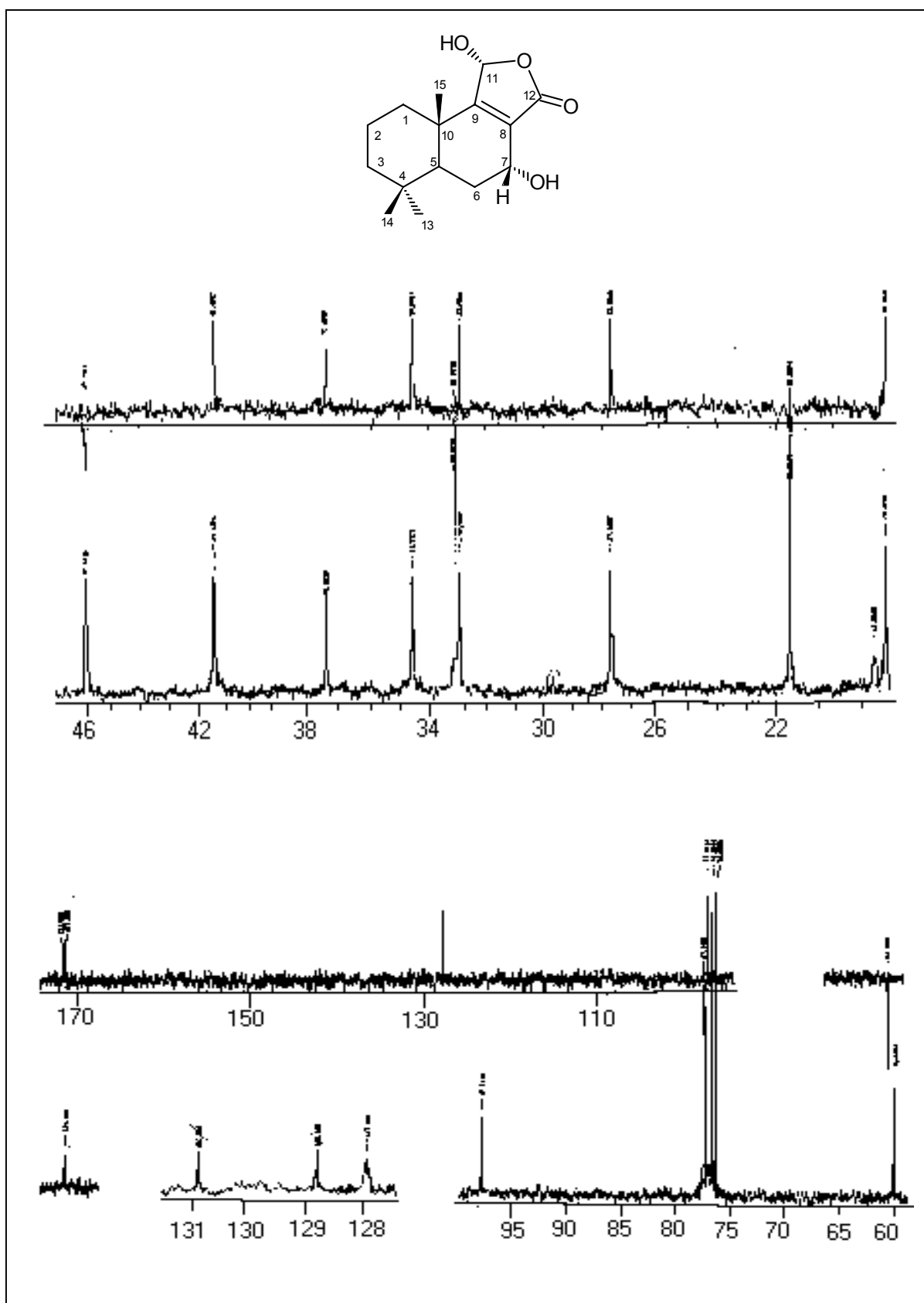


Figura 60 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (75,5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de DB-9

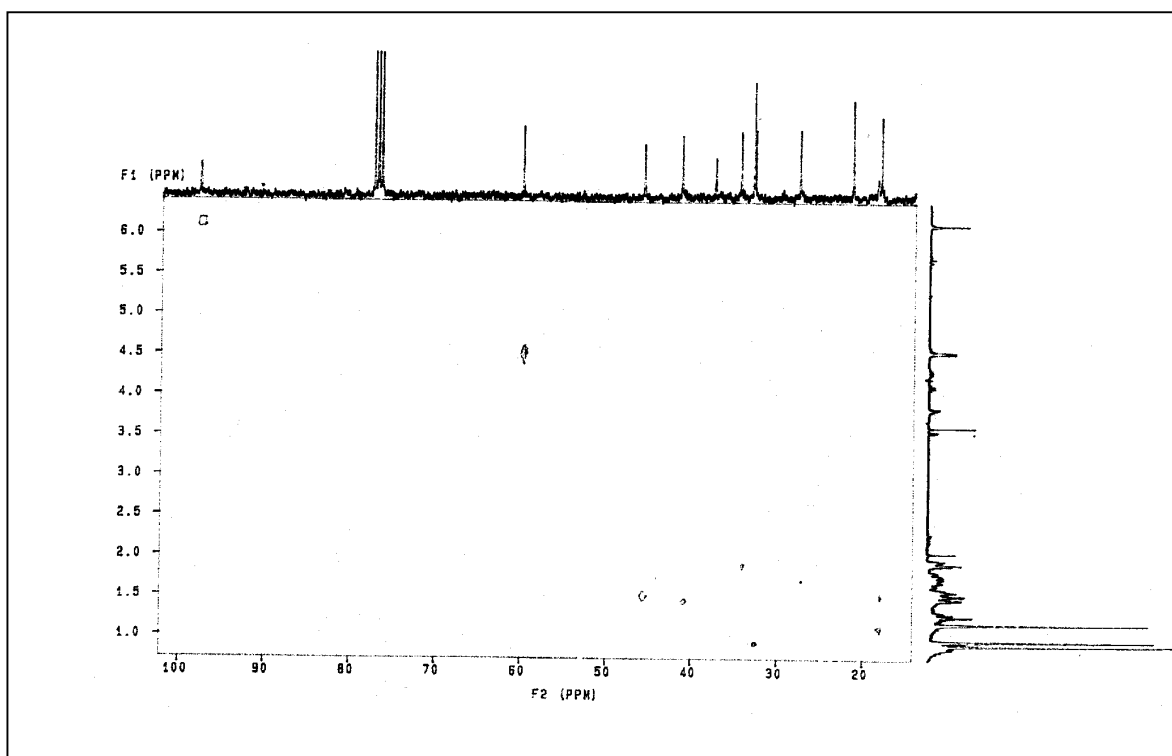


Figura 61 - Espectro de HETCOR de DB-9

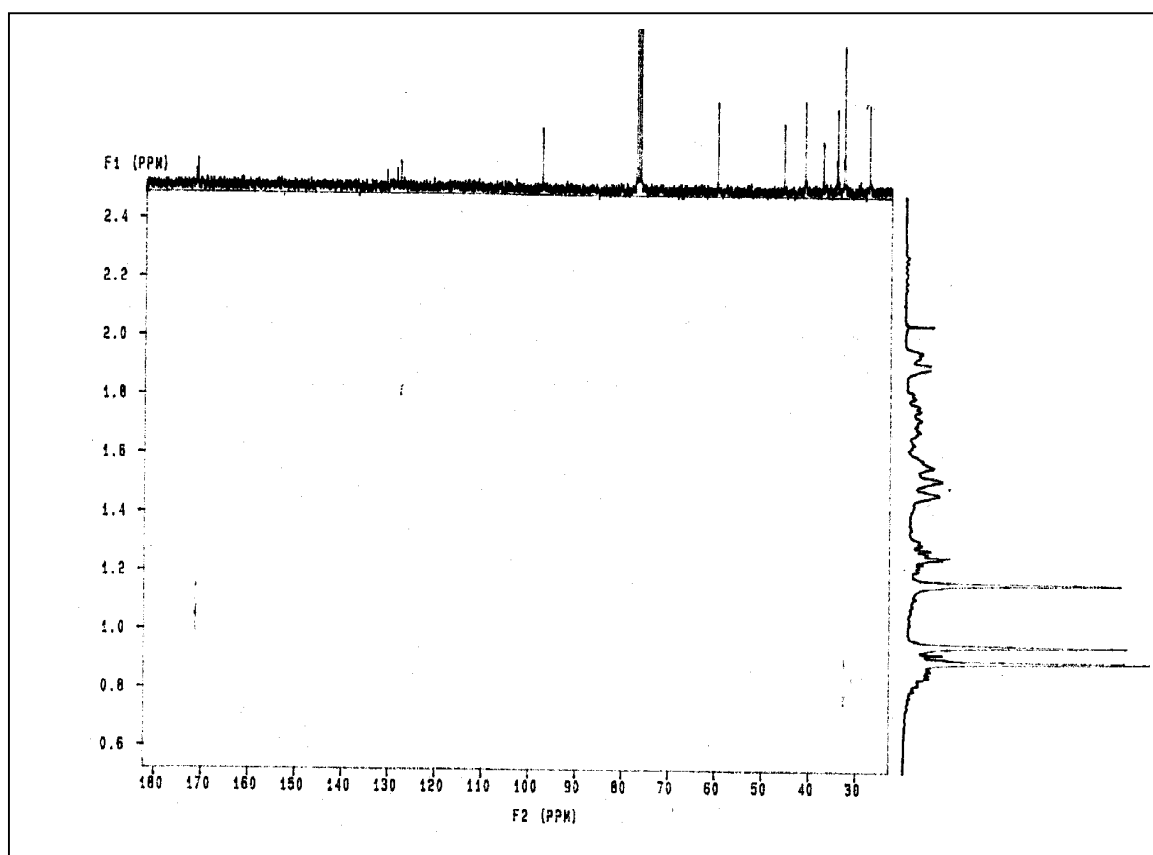
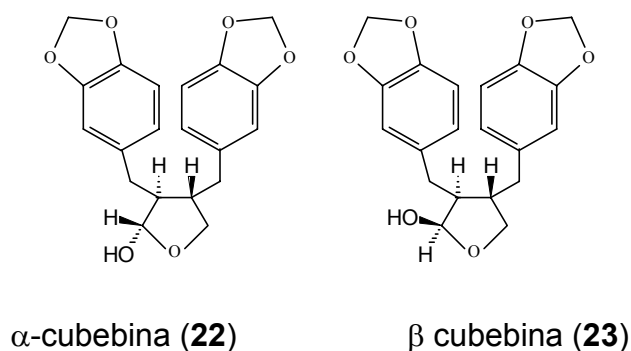


Figura 62 - Espectro de HETCOR LR de DB-9

### 5.3.2. COMPOSTO DBF-10

O composto DBF-10 foi isolado da fração de clorofórmio do extrato DBF  $\text{CHCl}_3$  da *D. brasiliensis*, após cromatografia em coluna, como um sólido branco, solúvel em  $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{Me}_2\text{CO}$  e  $\text{EtOH}$ . A estrutura foi confirmada através das análises espectroscópicas de IV, EM, RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  como uma mistura de duas lignanas,  $\alpha$  e  $\beta$  cubebina.<sup>105-106</sup>



O espectro no I.V. (Fig. 63) apresenta bandas de absorção em  $3344\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento de grupos OH, deformação axial de grupos metilenos em  $2948\text{ cm}^{-1}$ , deformação axial de  $\text{C}=\text{C}$  do anel aromático em 1608 e 1486, deformação axial de C-O em  $1122\text{ cm}^{-1}$ .

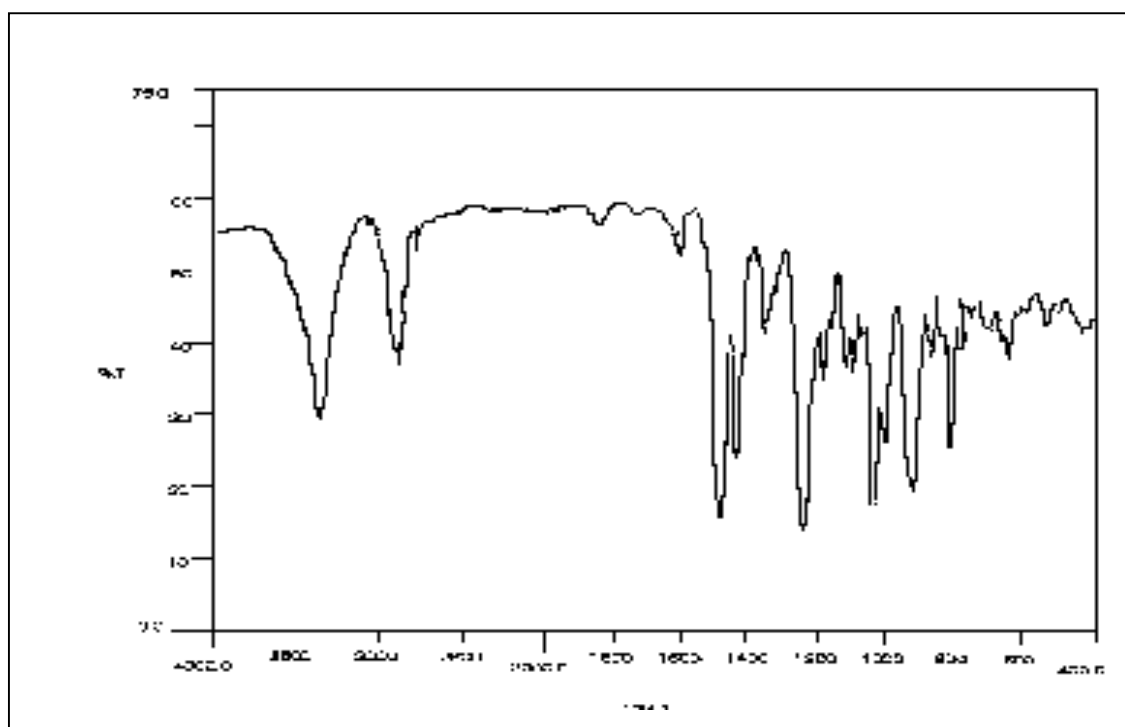


Figura 63 – Espectro no IV (pastilha de KBr) do DBF-10

Os valores de deslocamento químicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$  (Fig. 64,65 e 66) estão apresentados na tabela 15. Na região de  $\delta$  6,50 a 6,75 observam-se os hidrogênios aromáticos, e em  $\delta$  5,91 um singlete largo referente aos grupos metilenodioxi e também H-9 da  $\beta$ -cubebina. O hidrogênio H-9 da  $\alpha$ -cubebina aparece em  $\delta$  5,22. Em  $\delta$  3,57, 3,79, 3,99 e 4,09, (dd) estão os H-9. Na região de  $\delta$  2,00 a 3,00 aparecem sinais referentes a H-7, H-7', H-8 e H-8'. Os valores obtidos estão de acordo com os relatados para a  $\alpha$  e  $\beta$  cubebina.<sup>105,106</sup>

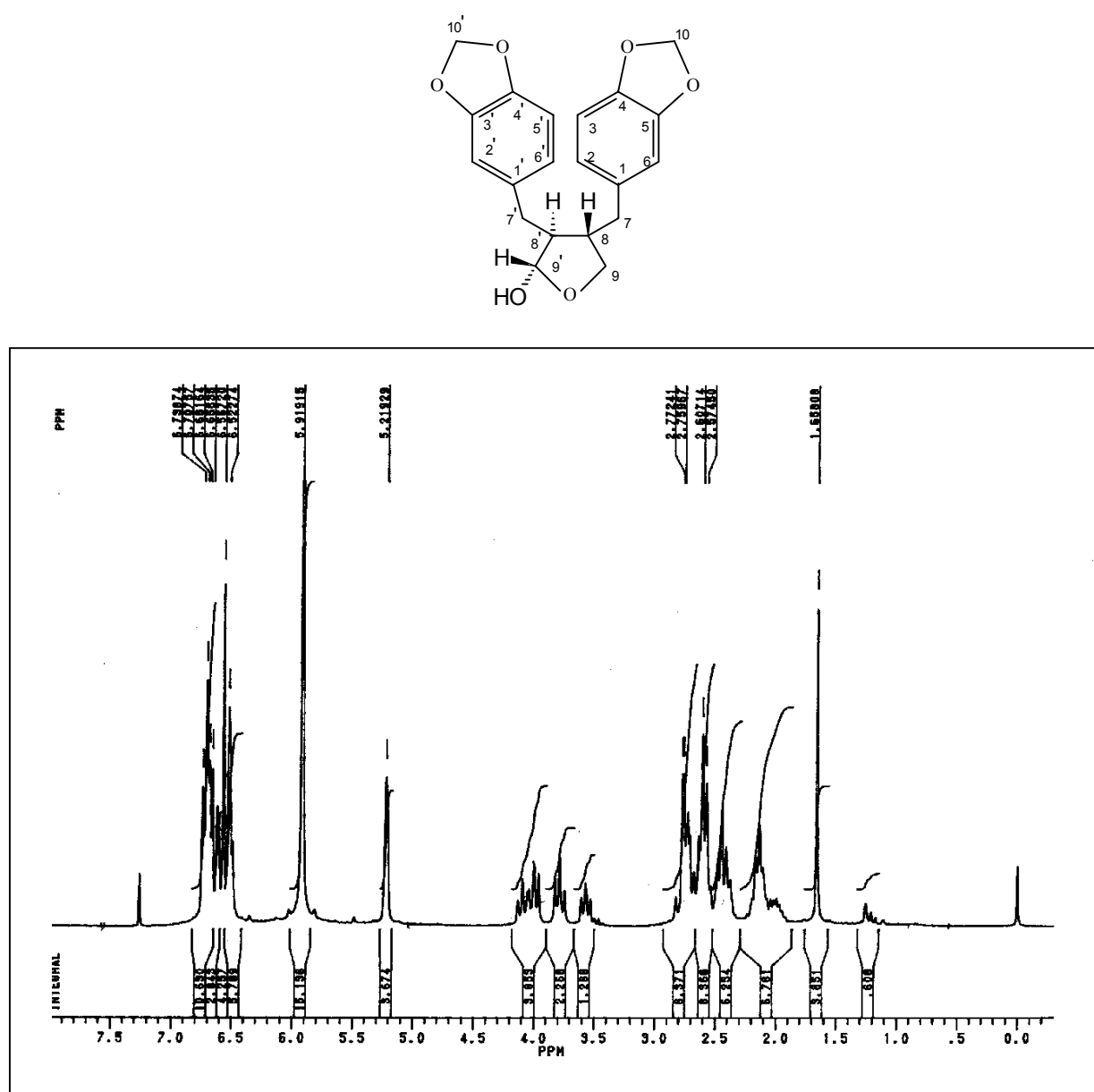


Figura 64 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de DBF-10

Tabela 15 – Valores de deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para DBF-10 e dados da literatura para  $\alpha$  e  $\beta$  cubebina<sup>105-106</sup>

Posição	$\delta$ $^1\text{H}$		$\delta$ $^{13}\text{C}$			
	DBF-10 $\alpha$	DBF-10 $\beta$	DBF-10	$\alpha$ - cubebina <sup>105</sup>	DBF-10	$\beta$ - cubebina <sup>106</sup>
1	-	-	133,2	132,3	134,6	134,5
1'	-	-	134,1	133,9	133,8	133,8
2	*	*	109,2	109,3	108,3	108,1
2'	*	*	109,3	109,3	108,3	108,1
3	-	-	147,7	147,5	147,7	147,6
3'	-	-	147,7	147,5	147,7	147,6
4	-	-	145,8	145,9	145,7	145,7
4'	-	-	145,8	145,9	145,7	145,7
5	*	*	108,1	109,5	108,1	109,1
5'	*	*	108,1	109,0	108,1	109,1
6	*	*	121,7	121,9	121,6	121,7
6'	*	*	121,6	121,6	121,4	121,4
7	2,75	2,75	39,3	39,5	33,6	33,5
7'	2,53	2,51	38,4	38,7	38,9	38,8
8	2,83	2,83	53,1	53,1	52,1	51,9
8'	2,43	2,14	45,9	45,1	42,9	42,8
9	5,22	5,92	103,4	103,5	98,9	98,7
9'	4,09	3,99	72,5	72,7	72,2	72,4
	3,57	3,79				
CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	5,92	5,91	100,8	101,1	100,8	100,8
	CDCl <sub>3</sub> / 300 MHz		CDCl <sub>3</sub> 75 MHz		CDCl <sub>3</sub> MHz	

\*  $\delta$  6,5 a 6,8

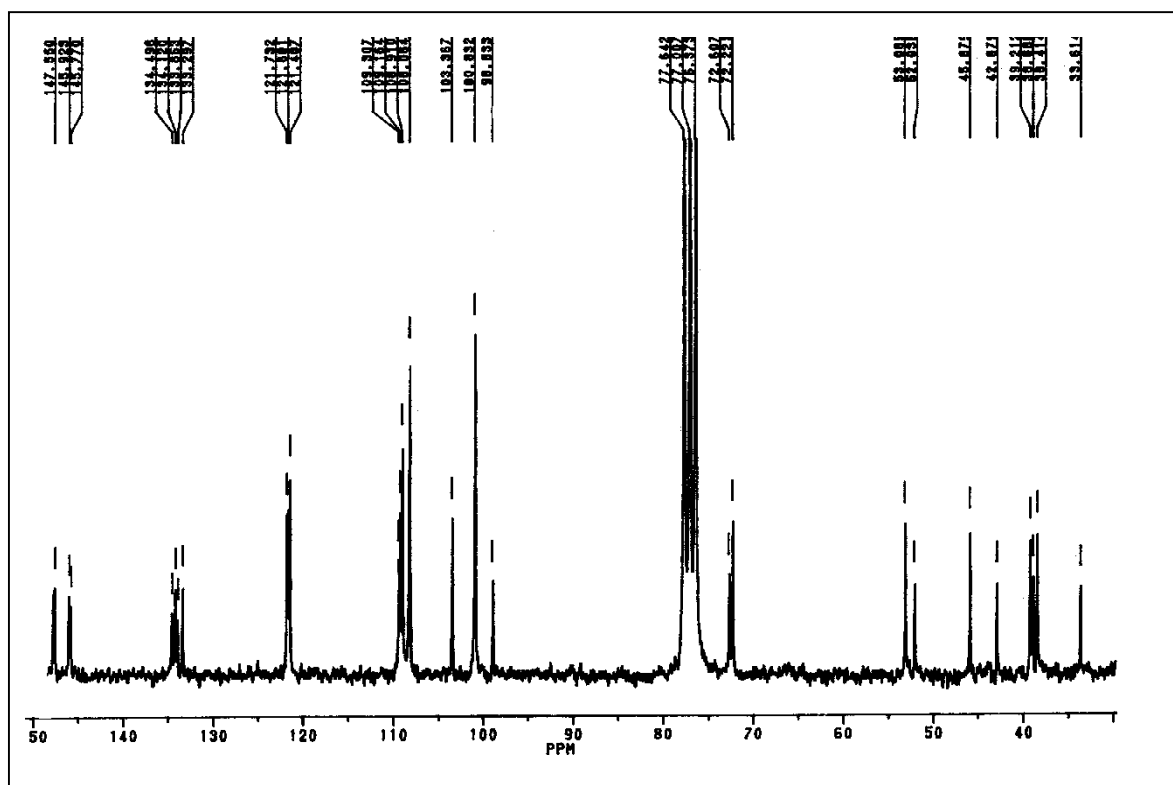


Figura 65 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (75,5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de DBF-10

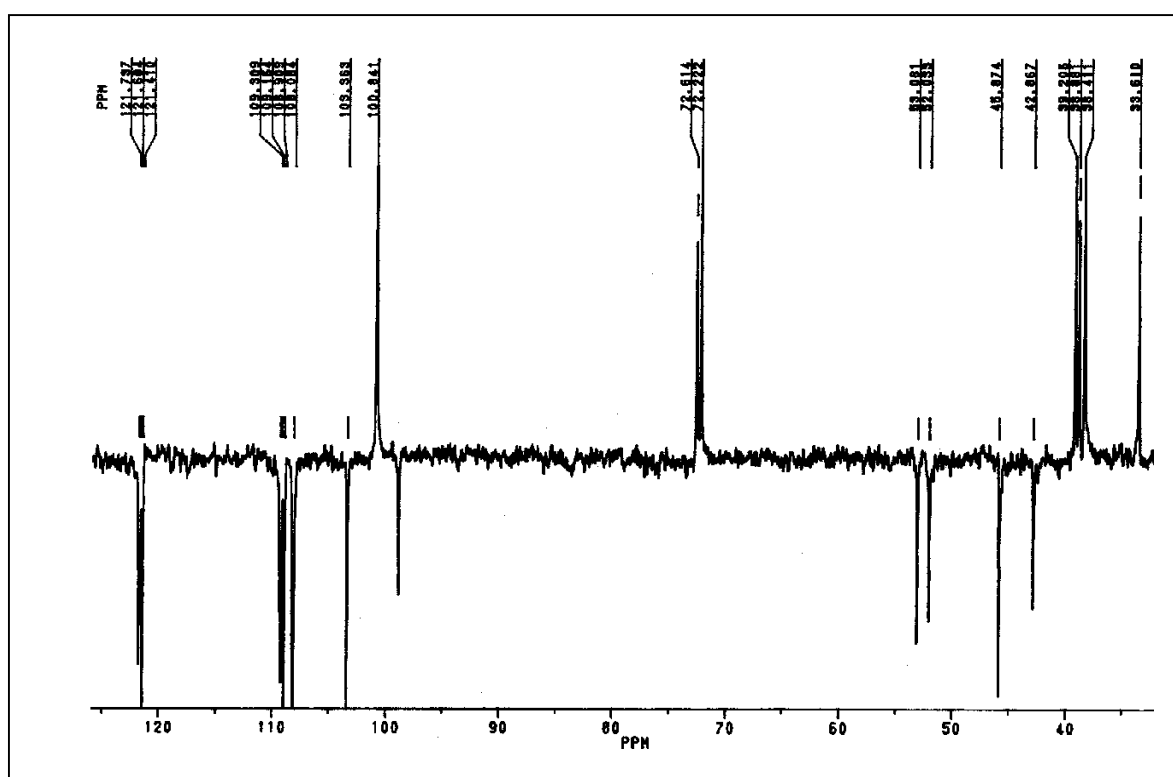


Figura 66 – Espectro de DEPT (75,5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de DBF-10



O espectro de massas de baixa resolução (Fig. 67) apresenta o pico do íon molecular em  $m/z$  356 [ $M^+$ ], Outros picos característicos são mostrados na Fig. 68, Os picos em  $m/z$  91 [ $C_7H_7^+$ ] e 77 [ $C_6H_5^+$ ] são indicativos do anel benzênico.

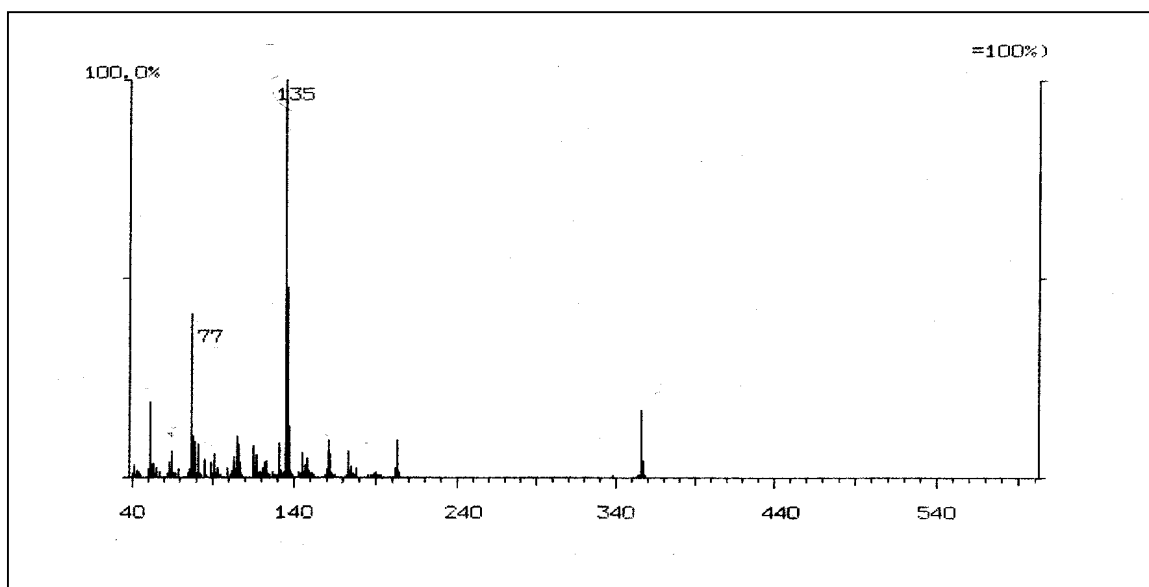


Figura 67 – Espectro de massas (70 eV) do DBF-10

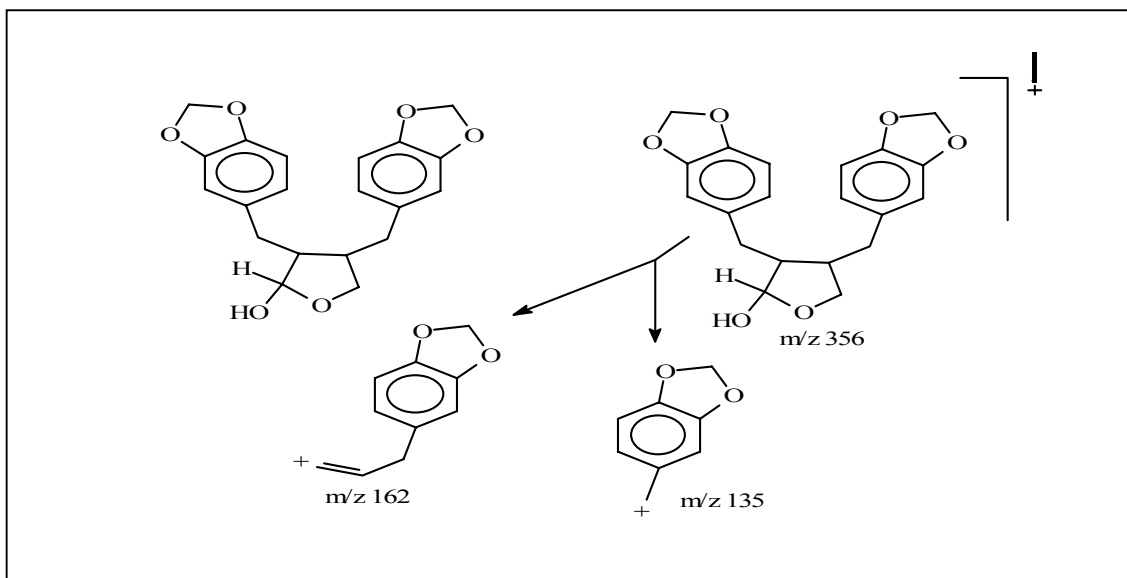


Figura 68 – Proposta de fragmentação do DBF-10

Estas lignanas haviam sido isoladas anteriormente da *Drimys angustifolia*.<sup>46</sup> Elas também foram encontradas nos gêneros *Virola*,<sup>105</sup> *Piper*,<sup>106</sup> *Aristolochia*<sup>107</sup> e *Protium*.<sup>108</sup>

#### 5.4. MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS NO POLIGODIAL

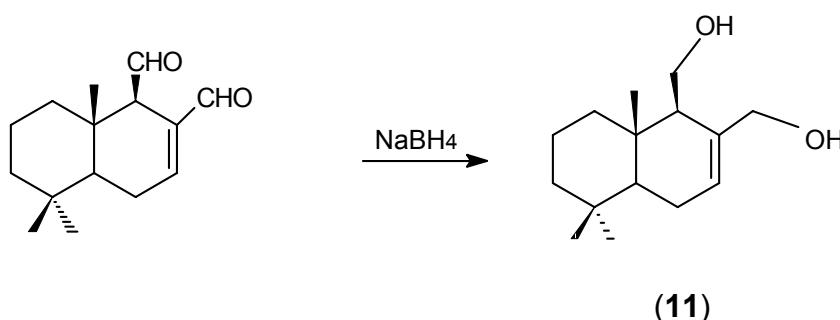
As modificações realizadas no poligodial não tiveram como objetivo principal o rendimento, mas sim a obtenção de quantidades suficientes dos produtos modificados para a realização dos testes farmacológicos.

Os dois principais grupos funcionais que podem ser modificados no poligodial são os dois grupos aldeídos dos carbonos C-11 e C-12 e a dupla ligação entre os carbonos C-6 e C-7.

Todas as rotas sintéticas utilizadas neste trabalho já foram reportadas na literatura, com pequenas modificações. A seguir, serão discutidos alguns aspectos considerados relevantes observados nas reações utilizadas.

##### 5.4.1. REAÇÃO DE REDUÇÃO DOS GRUPOS ALDEÍDICOS DO POLIGODIAL

Os grupos aldeídicos do poligodial foram reduzidos utilizando-se  $\text{NaBH}_4$  como redutor, por ser um reagente seletivo. Obteve-se uma mistura que foi purificada por cromatografia em coluna, obtendo o composto reduzido (DR-1) conhecido como drimendiol (**11**) com rendimento de 60%. Este composto havia sido isolado da *Drimys*.<sup>46</sup>



O espectro no I.V (Fig. 69) apresenta banda de absorção em  $3320\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento de grupos OH,  $2924\text{ cm}^{-1}$  estiramento de metila,  $1458\text{ cm}^{-1}$  estiramento C-O. As bandas referentes as carbonilas não estão presentes, confirmando que a redução foi efetuada.

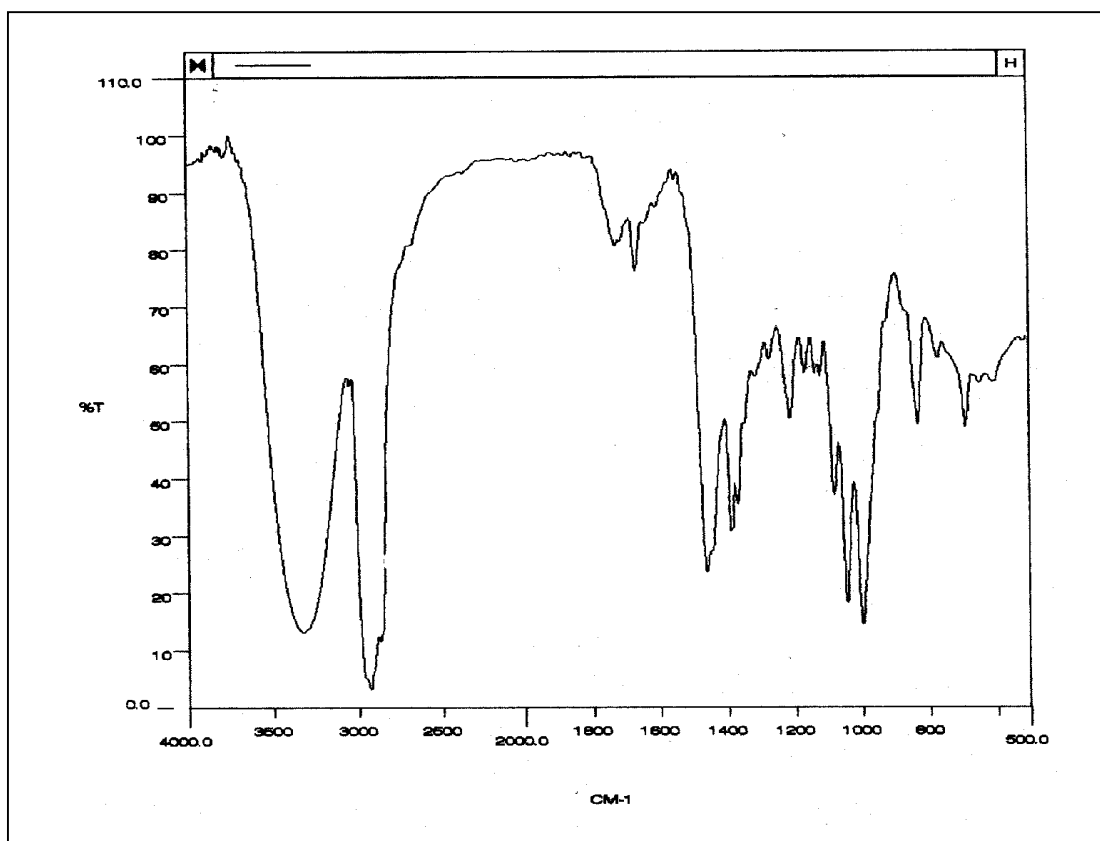


Figura 69 – Espectro no IV (pastilha de KBr) de DR-1

Pelo espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Fig. 70) pode-se observar os dois grupos hidroxilas primários ( $\delta$  3,87 e 3,65, 4,35 e 3,94), e o próton vinílico em  $\delta$  5,75. A presença de 3 singletes em  $\delta$  0,87, 0,88 e 0,75 indicam as 3 metilas existentes. Em  $\delta$  2,15 uma absorção como singlete largo referente H-9.

A Tab. 16 mostra os valores de deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (Fig. 71 e 72) obtidos para DR-1 e dados da literatura para o drimendiol.

Tabela 16 – Valores de deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para DR-1 e dados da literatura para drimendiol<sup>46</sup>

Posição	DR-1 $^1\text{H}$ $\delta$ mult.	DR-1 $^{13}\text{C}$ $\delta$	Drimendiol <sup>46</sup> $^1\text{H}$ $\delta$ mult.	Drimendiol <sup>46</sup> $^{13}\text{C}$ $\delta$
1		39,2	1,95 $\alpha$ 1,15 $\beta$	39,3
2		18,7	1,40 $\alpha$ 1,05 $\beta$	42,0
3		41,9	1,48	18,8
4		32,9		32,3
5		49,3	1,24	49,3
6		23,5	2,05 $\alpha$ 1,80 $\beta$	23,5
7	5,75, m	127,4	5,77	127,1
8		136,8		136,7
9	2,15, sl	54,4	2,15, sl	54,3
10		35,6		35,5
11a	3,87, dd	61,4	3,87, dd	61,1
11b	3,65		3,64, dd	
12a	4,35, dd	67,4	4,33, dd	67,2
12b	3,94, dd		3,94, dd	
13	0,87, s	33,2	0,86, s	33,2
14	0,88, s	21,8	0,88, s	21,9
15	0,75, s	14,5	0,74, s	14,5
	200 MHz CDCl <sub>3</sub>	50 MHz CDCl <sub>3</sub>	400 MHz CDCl <sub>3</sub>	100 MHz CDCl <sub>3</sub>

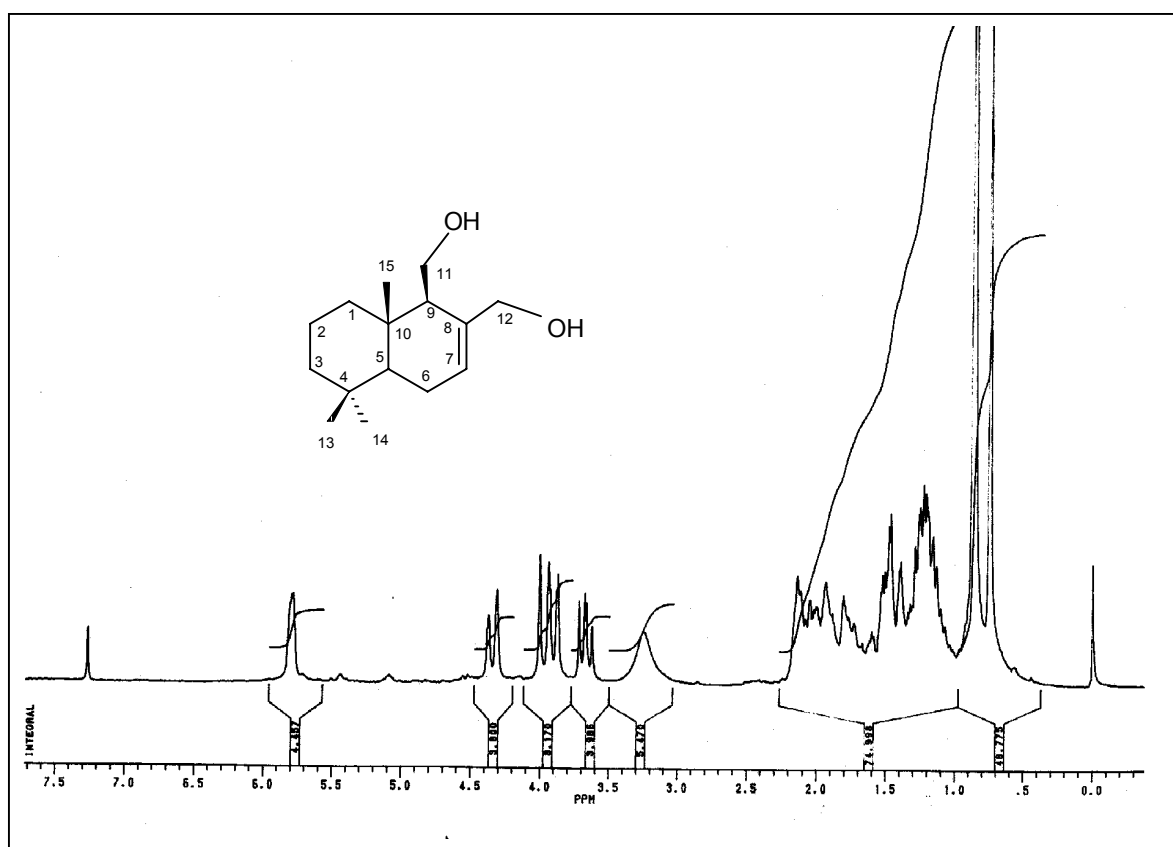


Figura 70 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de DR-1

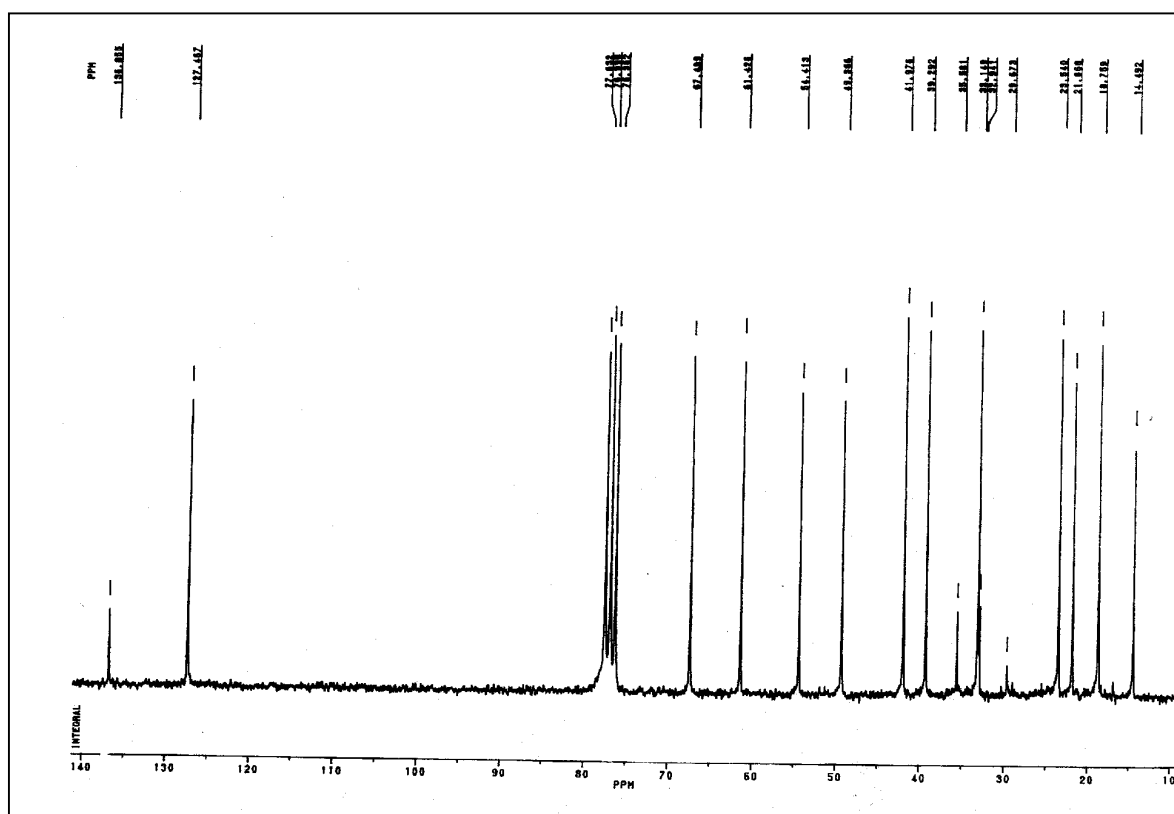
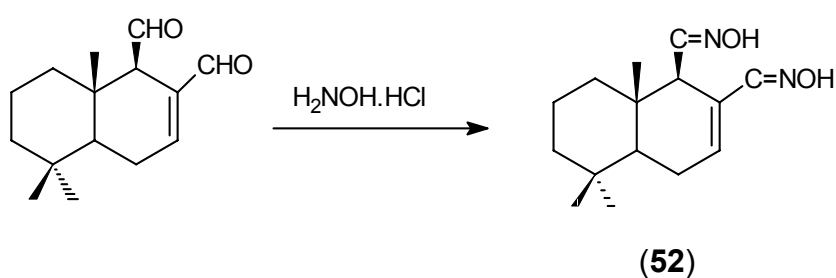


Figura 71 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de DR-1

#### 5.4.2. OBTENÇÃO DA OXIMA DO POLIGODIAL

A dioxima (**52**) foi obtida pela reação de poligodial com cloridrato de hioxilamina, conforme demonstrado abaixo. Na reação obteve-se uma mistura que foi cromatografada em coluna, obtendo DR-2 (**52**) com rendimento de 43%. Pela análise dos dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  verificou-se a formação de dois isômeros conformacionais e de mais um composto não identificado.



No espectro no IV (Fig. 72) pode ser observada a banda referente ao estiramento de OH da oxima em  $3256\text{ cm}^{-1}$ , em  $1556\text{ cm}^{-1}$  e deformação axial de C=N.

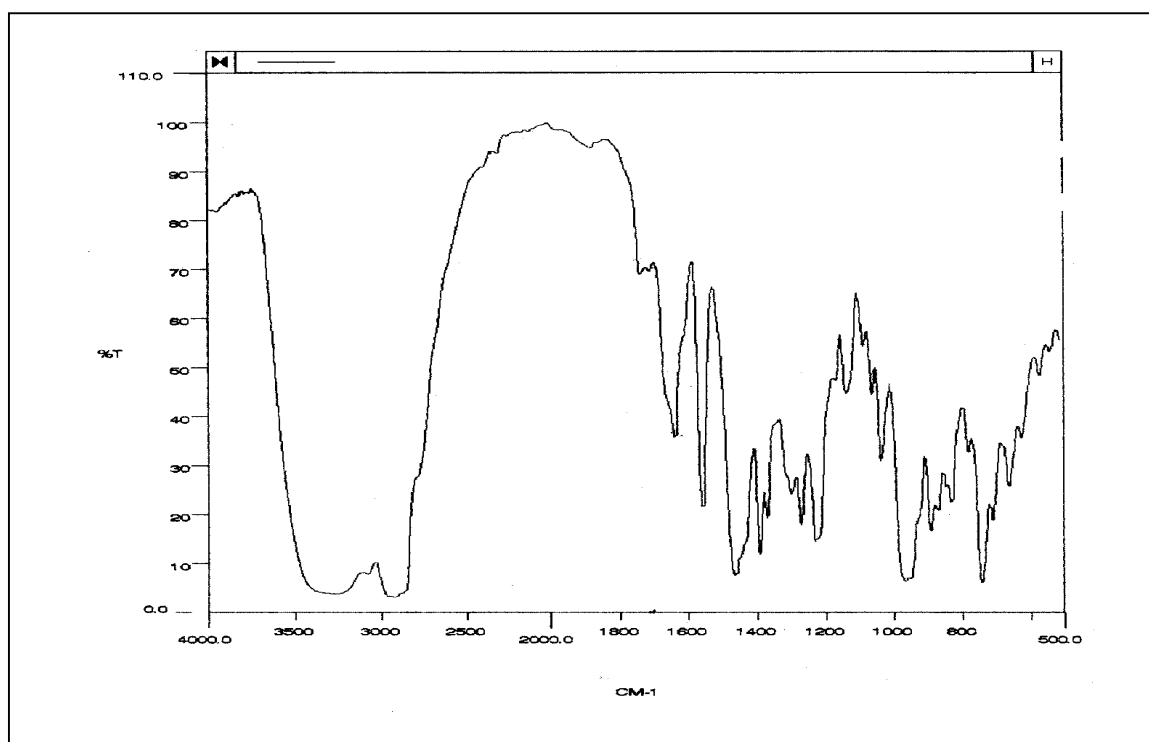


Figura 72 – Espectro no IV (pastilha de KBr) do (**51**)

Na Tab. 17 podem ser observados os deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . As duas dioximas obtidas não são estericamente idênticas e estão em quantidades diferentes como podem ser observados nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$  (Fig. 73, 74 e 75) pela duplicidade dos sinais. A dioxima pode ser observada pelos sinais em  $\delta$  7,35 e 7,28 e d, 7,65 e 7,62, s no espectro de RMN  $^1\text{H}$  e sinais em  $\delta$  152,3 e 151,8 e 137,5 e 137,1 no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ .

Tabela 17 – Valores de deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de DR-2

Posição	DR-2 $^1\text{H}$ $\delta$ mult. (J Hz)	DR-2 $^{13}\text{C}$ $\delta$
1		39,6 38,8
2		42,1 42,0
3		18,4 18,3
4		34,0
5		48,8 49,8
6	2,12	24,3 24,9
7	6,20, m 5,92, m	153,4 152,8
8		130,4 131,2
9	3,00, m	51,3 50,8
10		36,5 37,3
11	7,35, d 7,28, d	152,3 151,8
12	7,65, s 7,62, s	137,5 137,1
13	0,83 0,87	33,1
14	0,92	22,1 21,0
15	0,94	15,1 14,4
	200 MHz $\text{CDCl}_3$	50 MHz $\text{CDCl}_3$

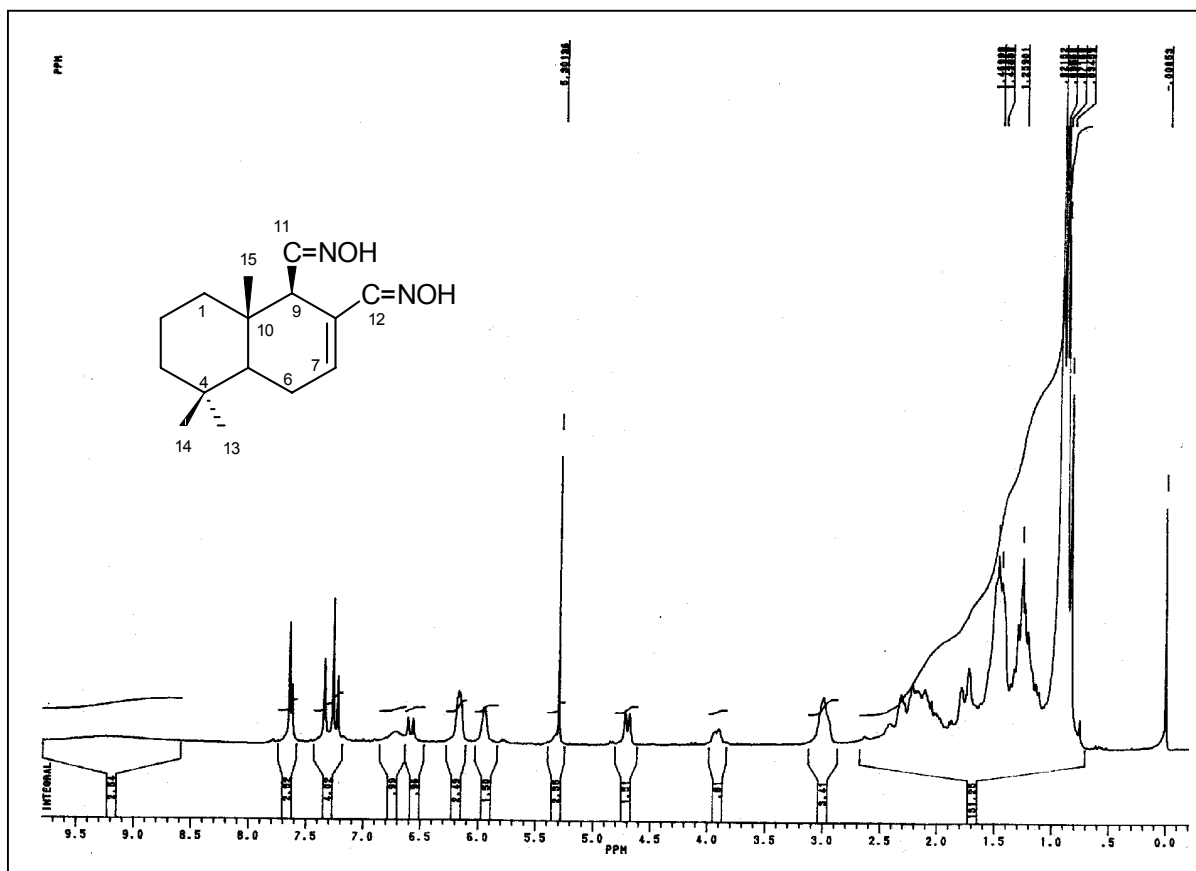


Figura 73 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de DR-2

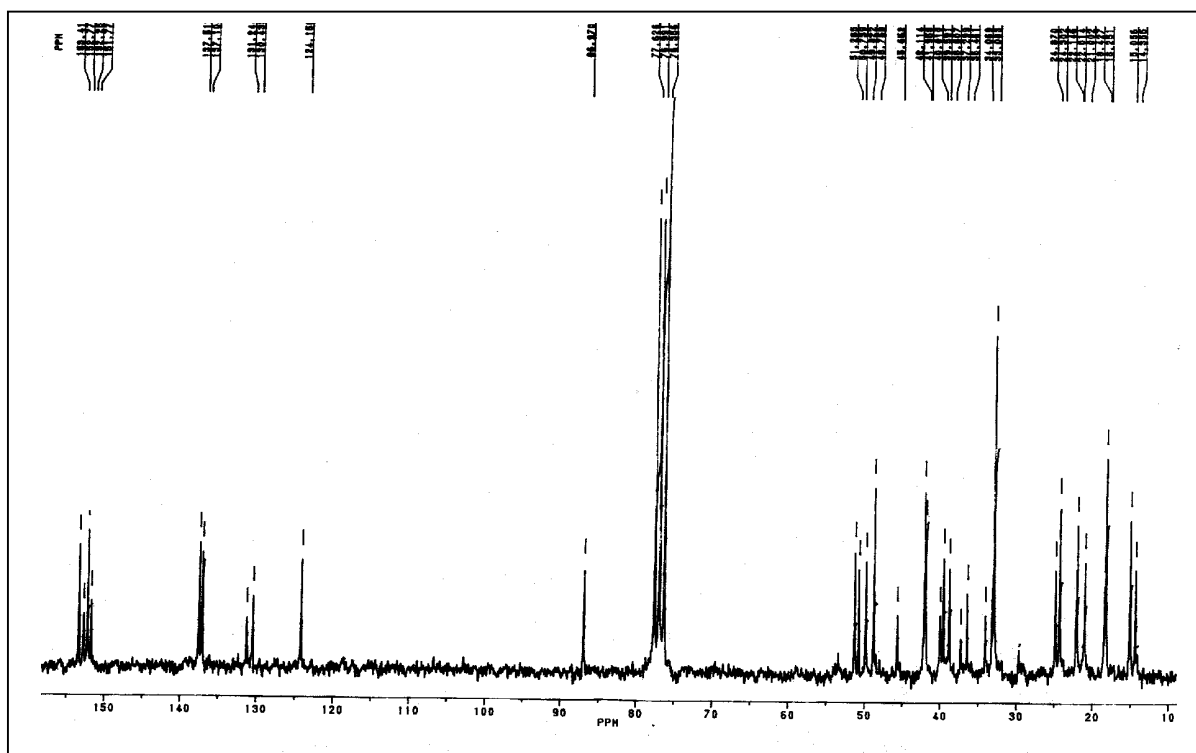
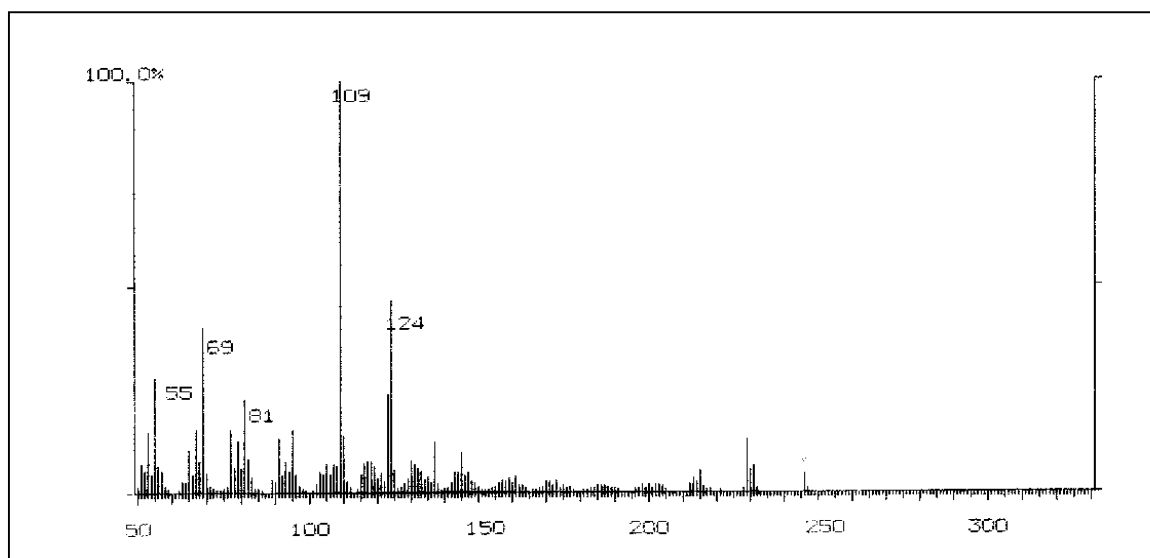


Figura 74 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de DR-2



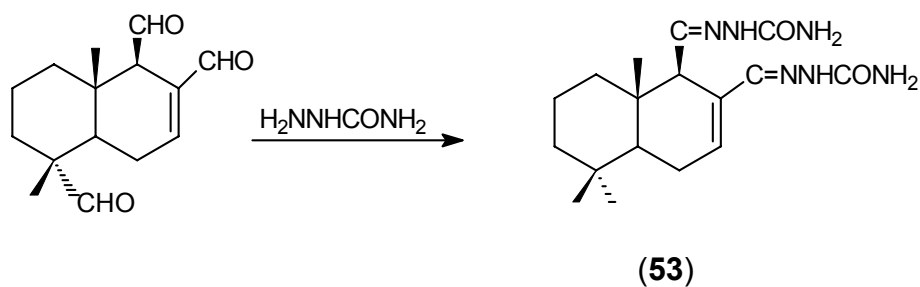
NO espectro de massas (Fig. 76) não se observa o pico do íon molecular em  $m/z$  264, são observados picos em  $m/z$  246 [ $M^+ - H_2O$ ] e 229 [246 – OH]. As fragmentações do anel drimânico podem ser observadas em  $m/z$  124 e 109.



A presença de um terceiro composto pode ser observada no espectro de RMN  $^1\text{H}$  pelos sinais em  $\delta$  0,87, s; 3,90, m; 1,51, d; 5,30, s; 5,95, m e 6,58, d e no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  pelos sinais em  $\delta$  21,0, 38,8, 45,6, 86,9 e 124,1.

### 5.4.3. OBTENÇÃO DO DERIVADO SEMICARBAZONA DO POLIGODIAL

A semicarbazona (**53**) foi obtida pela reação de poligodial com cloridrato de semicarbazida, conforme demonstrado abaixo.



Para esta reação, somente tem-se o espectro de IV (Fig. 77), onde pode-se observar absorções intensas nas regiões de 3446, 3306 e 3202  $\text{cm}^{-1}$  referentes a a vibrações de deformação axial de N-H e de C=N em 1680  $\text{cm}^{-1}$ .

Serão feitas outras análises na tentativa de confirmação da estrutura.

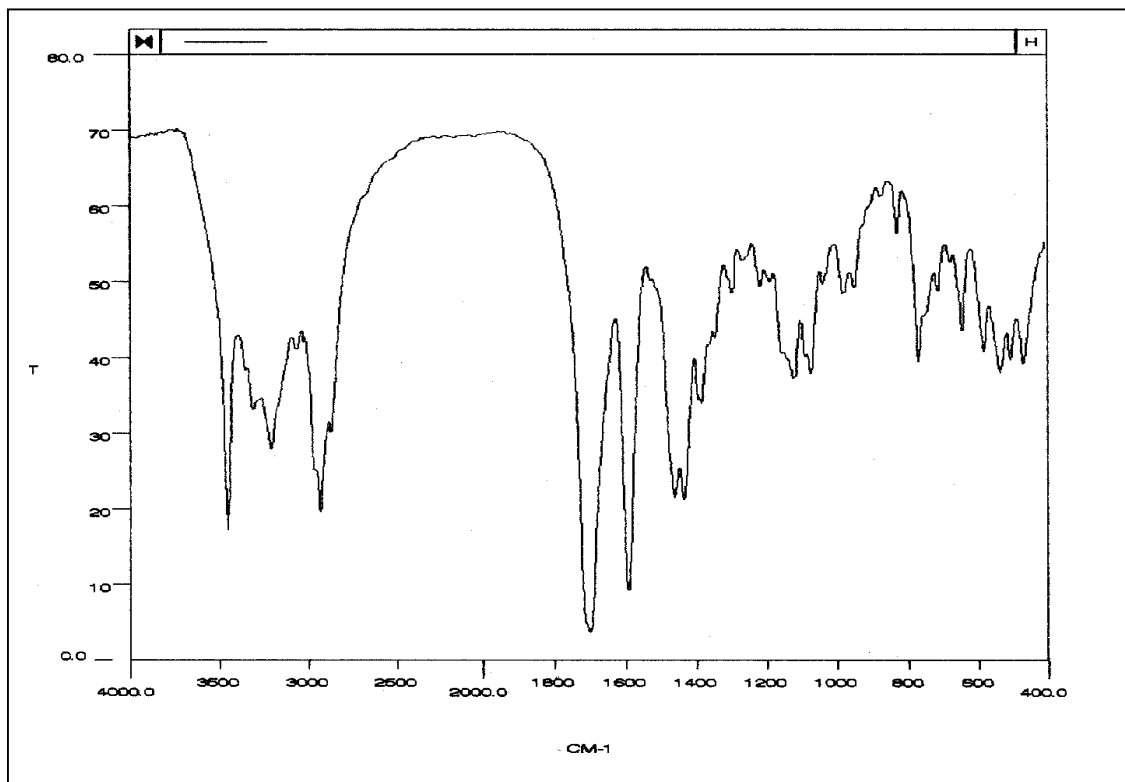
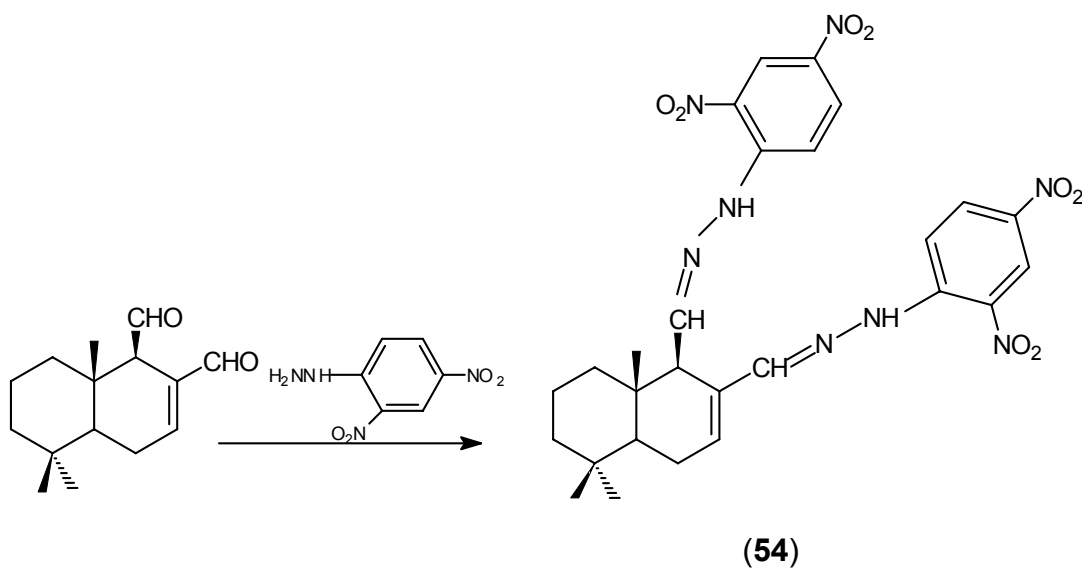


Figura 77 – Espectro no IV (pastilha de KBr) DR-3

#### 5.4.4. OBTENÇÃO DO DERIVADO 2,4-DINITROFENIL-HIDRAZONA DO POLIGODIAL

O derivado 2,4-dinitrofenil-hidrazona do poligodial (**54**) foi obtido pela reação de poligodial com 2,4-dinitrofenil-hidrazina, conforme demonstrado abaixo. Na reação obteve-se um precipitado amarelo que foi purificado por lavagens com MeOH, denominado DR-4, rendimento de 32%.



Na Tabela 18 estão apresentados os valores de deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (Fig. 78, 79) obtidos para o DR-4 (**54**).

Figura 79 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (75,5 MHz, acetona- $\text{d}_6$ ) de DR-4.

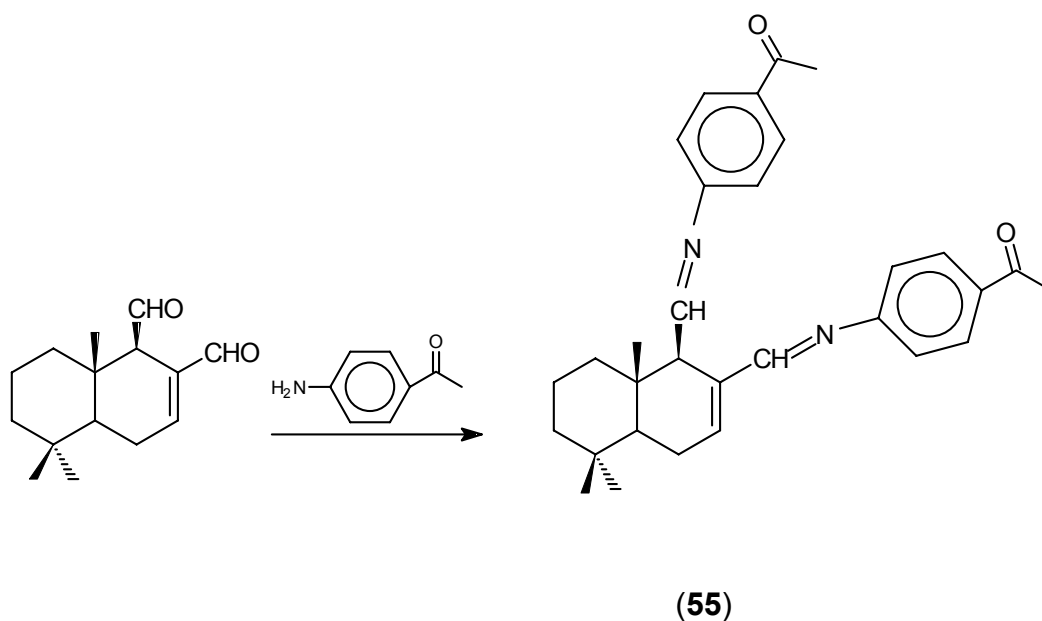
Tabela 18 – Valores de deslocamento químicos ( $\delta$ ) de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  obtidos para DR-4

Posição	DR-4	DR-4	Posição	DR-4	DR-4
	$^1\text{H}$ $\delta$ mult. (J Hz)	$^{13}\text{C}$ $\delta$ /APT		$^1\text{H}$ $\delta$ mult. (J Hz)	$^{13}\text{C}$ $\delta$ /APT
1		40,50	1'		156,99
2		19,02	2'		
3		42,73	3'	9,03, d, J = 2,57	129,59
4		37,86	4'		117,42
5		49,71	5'	8,53, dd, J = 9,61 e 2,68	123,65
6		25,56	6'	8,29, d J = 9,61	117,47
7	6,63, m	124,02	1''		157,04
8		138,20	2''		
9	3,33, m	55,15	3''	8,84, d, J = 2,57	130,86
10		33,78	4''		117,53
11	7,99, d, J = 9,48	152,65	5''	7,48, dd, J = 9,61 e 2,68	123,65
12	8,27, s	142,73	6''	7,61, d, J = 9,61	117,58
13	1,04, s *	33,40	NH	11,37	
14	1,00, s *	22,28	NH	11,19	
15	1,97, s *	15,69			
				300 MHz	75,5 MHz
				acetona-d <sub>6</sub>	acetona-d <sub>6</sub>

\* os valores podem estar trocados

#### 5.4.5. REAÇÃO DO POLIGODIAL COM p-AMINOACETOFENONA

O derivado p-aminoacetofenona do poligodial (**55**) foi obtido pela reação de poligodial com p-aminoacetofenona, conforme demonstrado abaixo. Na reação obteve-se um precipitado marrom que foi purificado por cromatografia em coluna, denominado DR-5, rendimento de 26%.



No espectro de RMN <sup>1</sup>H (Fig. 80) observa-se em  $\delta$  0,74, 0,91 e 1,25, singletes referentes as metilas 13, 14 e 15. As metilas ligadas as carboxilas apresentam sinais em  $\delta$  2,51 e 2,60. Na região de  $\delta$  6,5 a 8,2 são observados sinais dos prótons aromáticos e de H-7.

No espectro de RMN <sup>13</sup>C (Fig. 81) são observados sinais em  $\delta$  196,6 e 196,1 referentes as carbonilas. Na região de  $\delta$  110 a 151 aparecem os carbonos aromáticos e alifáticos, de  $\delta$  15 a 48 observam-se os sinais das metilas, metilenos e metinos do anel drimânico.



#### 5.4.6. REAÇÃO DO POLIGODIAL COM METILAMINA E ETILAMINA

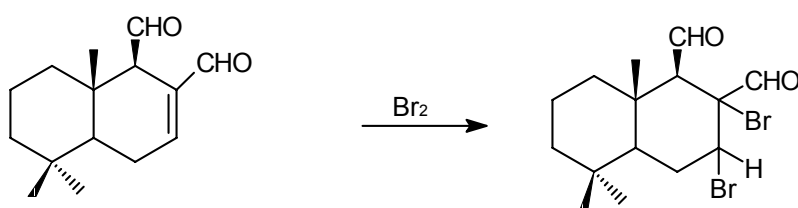
A reação de poligodial com aminas primárias, segundo a literatura, processa-se rapidamente em condições brandas para formar pirróis 3,4-dissubstituídos.<sup>82,109</sup> Procedeu-se o experimento utilizando poligodial e metilamina, obteve-se um produto instável, que não foi possível caracteriza-lo. O mesmo aconteceu com a etilamina

#### 5.4.7. REAÇÃO DE OXIDAÇÃO DOS GRUPOS ALDEÍDICOS DO POLIGODIAL

Foram feitas várias tentativas de oxidação dos grupos aldeídos do poligodial. Utilizou-se  $\text{AgNO}_3$  como oxidante na tentativa de uma oxidação branda, porém não se obteve resultados positivos, o mesmo ocorreu com  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  suportado em sílica.

#### 5.4.8. REAÇÃO DE BROMAÇÃO DO POLIGODIAL

Nesta reação, esperou-se que o bromo reagisse com a dupla ligação entre os carbonos 7 e 8, conforme indicado abaixo:



Após cromatografia em coluna, aparentemente purificou-se um composto DR-8.

Na análise por CG observou-se a presença de dois compostos com tempos de retenção em 8,02 (65%) e 8,11min. (34%), porém em c.c.d. foi observada apenas uma mancha.



No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Fig. 82) são observados sinais em  $\delta$  0,91, 0,97 e 1,15 (s), que podem ser atribuídos as 3 metilas. Em  $\delta$  5,0 (dd), 5,20 (dd), 6,87 (s), 6,95 (s) podem ser atribuídos a prótons ligados a bromos.

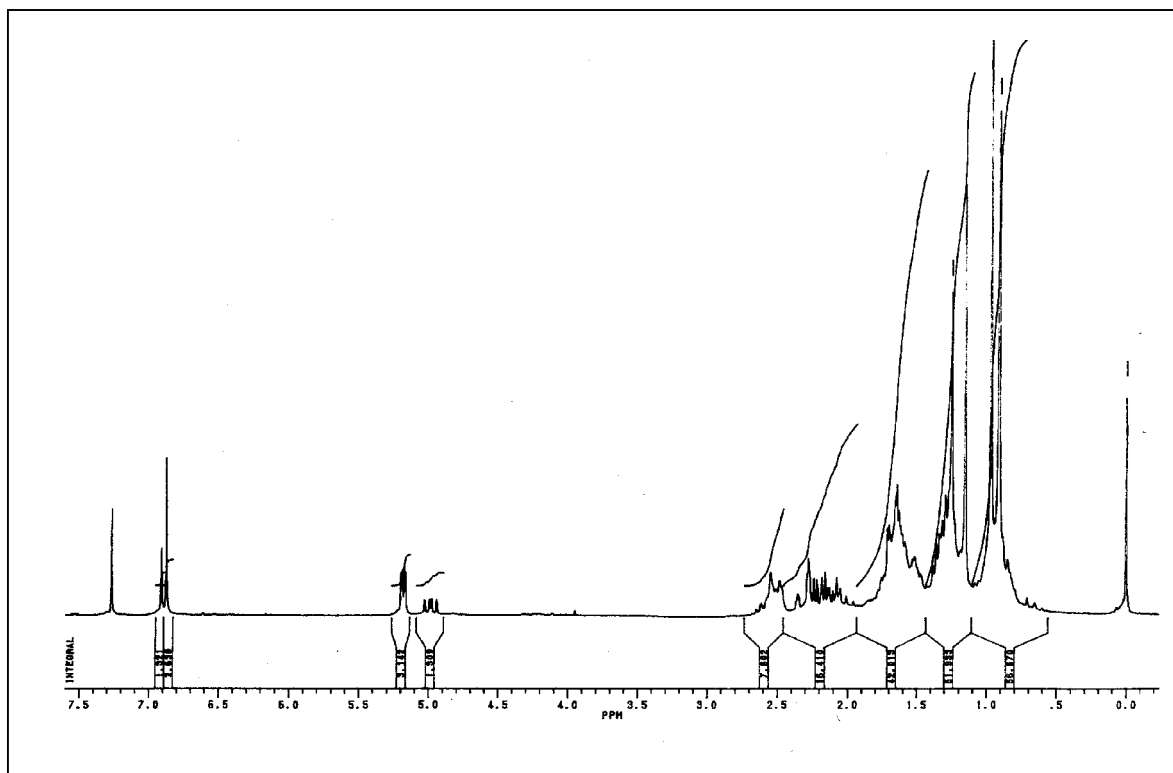


Figura 82 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de DR-8

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$  (Fig. 83 e 84) são observados os seguintes sinais -  $\delta$ : 17,92 ( $\text{CH}_2$ ), 18,10 ( $\text{CH}_2$ ), 19,39 ( $\text{CH}_3$ ), 19,60 ( $\text{CH}_3$ ), 21,24 ( $\text{CH}_3$ ), 21,74 ( $\text{CH}_3$ ), 29,06 ( $\text{CH}_2$ ), 29,69 ( $\text{CH}_2$ ), 31,40 ( $\text{CH}_2$ ), 32,69 ( $\text{CH}_3$ ), 33,02 ( $\text{CH}_3$ ), 33,58 ( $\text{CH}_2$ ), 33,83 ( $\text{CH}_2$ ), 35,50 (C), 41,08 ( $\text{CH}_2$ ), 41,22 ( $\text{CH}_2$ ), 47,02 (CH), 53,41 (?), 75,72 (?). A mistura pode ser observada pela duplicidade de sinais

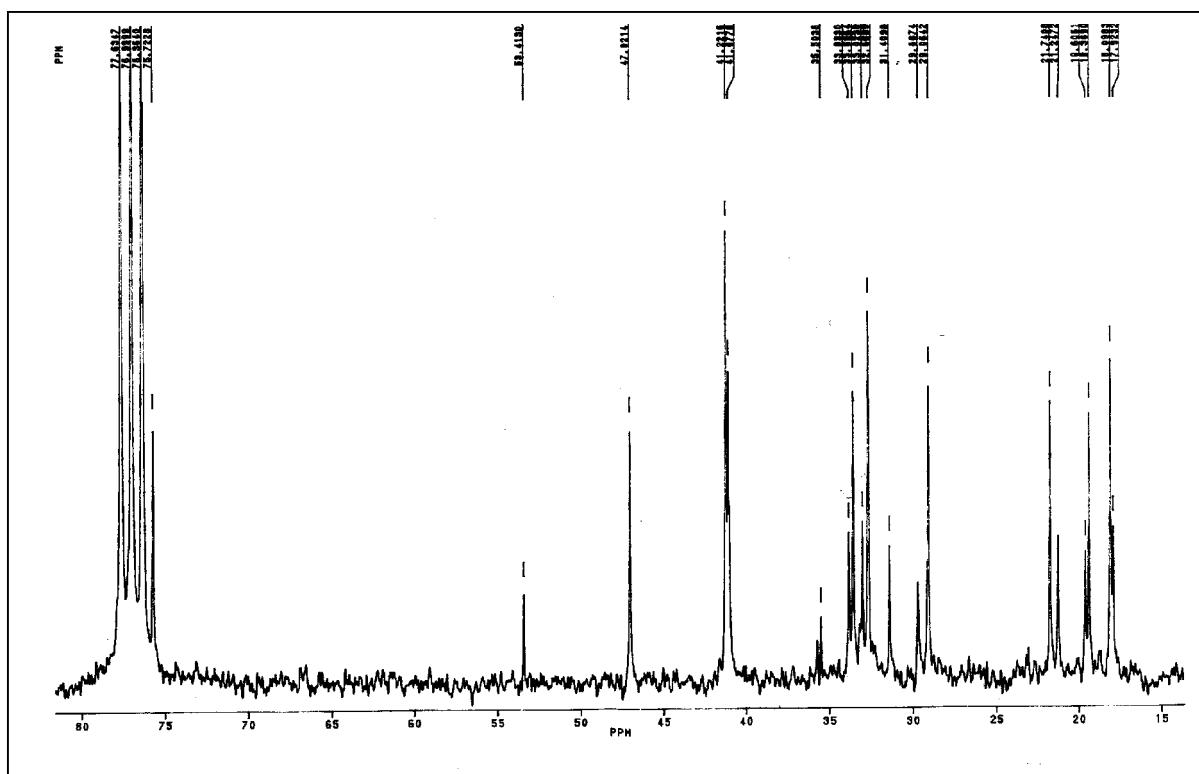


Figura 83 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de DR-8

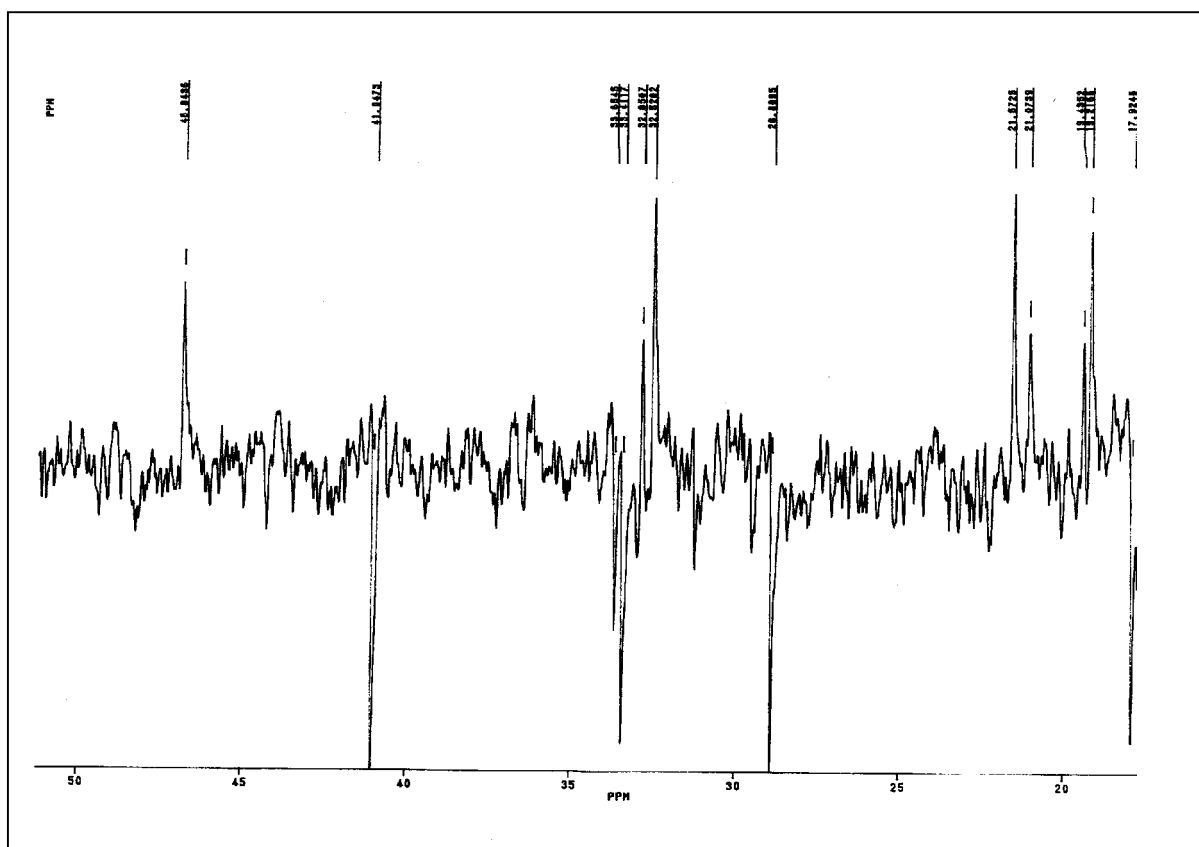
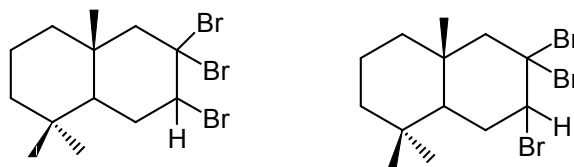


Figura 84 – Espectro de DEPT (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de DR-8

Aparentemente, podem ter sido formados os seguintes compostos:



Porem esta reação necessita de estudos adicionais.

#### 5.4.9. REAÇÃO DE EPOXIDAÇÃO DA DUPLA LIGAÇÃO DO POLIGODIAL

A tentativa de epoxidação da dupla ligação do poligodial com ácido m-cloroperbenzóico não foi eficiente, não foi possível purificar nenhum composto.

#### 5.4.10. REAÇÃO DO POLIGODIAL COM ETANOL E BENZENO

Sabe-se que o poligodial converte-se no seu epímero o isopoligodial em condições básicas.<sup>110</sup> Durante a tentativa de uma reação de Diels Alder do poligodial, com furano em EtOH sob refluxo, observou-se somente a conversão do poligodial em isopoligodial. Desta forma, solubilizou-se o poligodial em EtOH e deixou-se sob refluxo. Utilizou-se c.c.d. e CG para o acompanhamento da reação, foram retiradas alíquotas de hora em hora durante cinco horas. Na Fig. 85 pode ser observado o cromatograma do poligodial no início da reação (A) e depois de 1h. de refluxo (B). No cromatograma (B) pode-ser verificado que aproximadamente 60% do poligodial converteu-se a isopoligodial. O mesmo perfil foi observado durante toda a reação.

Realizou-se uma segunda reação solubilizando-se o poligodial em benzeno e deixado sob refluxo. Foram coletadas alíquotas a cada hora durante cinco horas. Conforme mostrado na Fig. 86 não houve a conversão do poligodial a isopoligodial.

Os resultados obtidos indicam que para ocorrer à conversão do poligodial para o seu epímero o isopoligodial é necessário solvente prótico e temperatura.

Estes resultados podem justificar a dificuldade encontrada em várias reações realizadas sem sucesso.

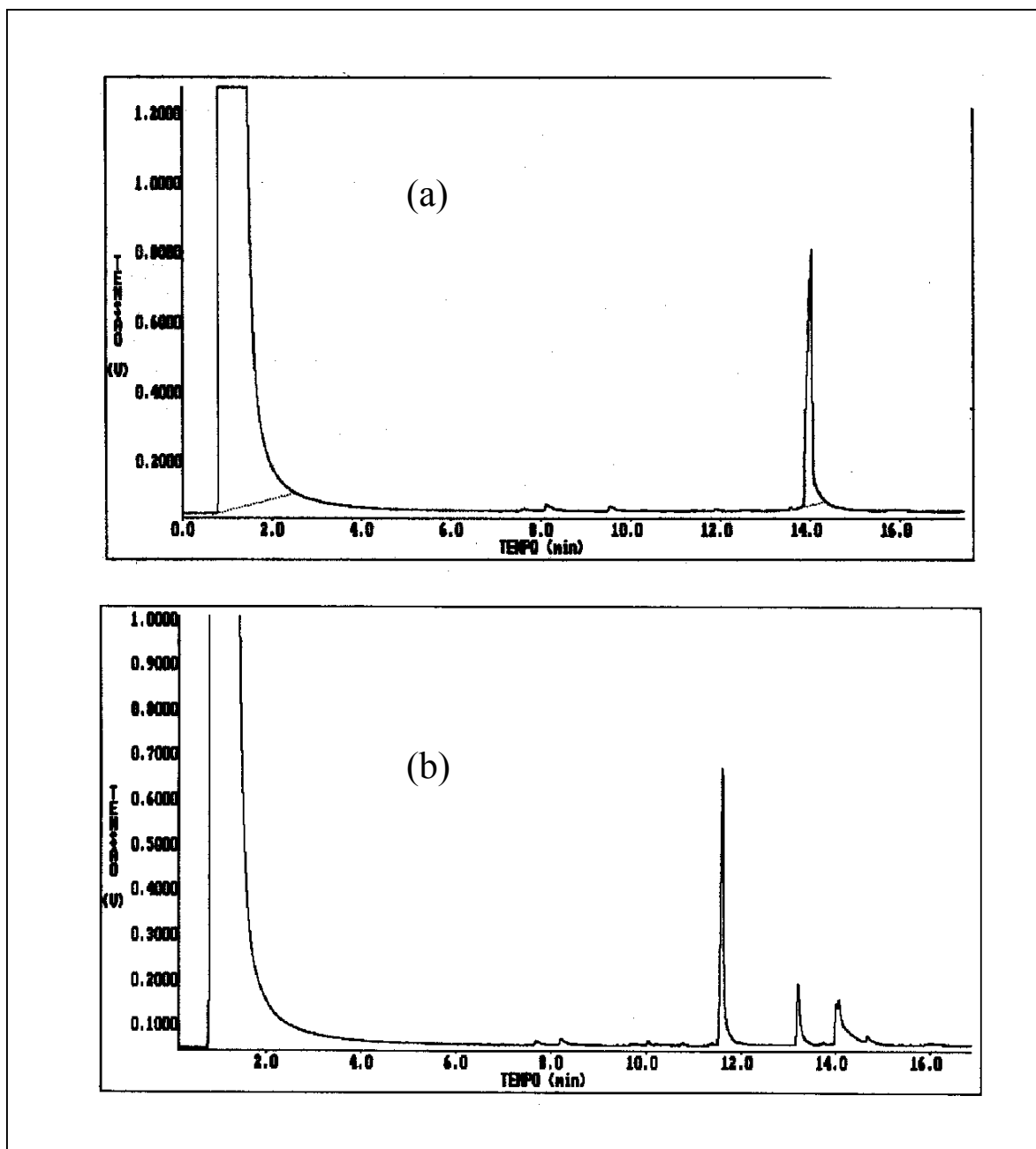


Figura 85 – Cromatograma do poligodial em etanol sob refluxo (a) início da reação (b) após uma hora de reação

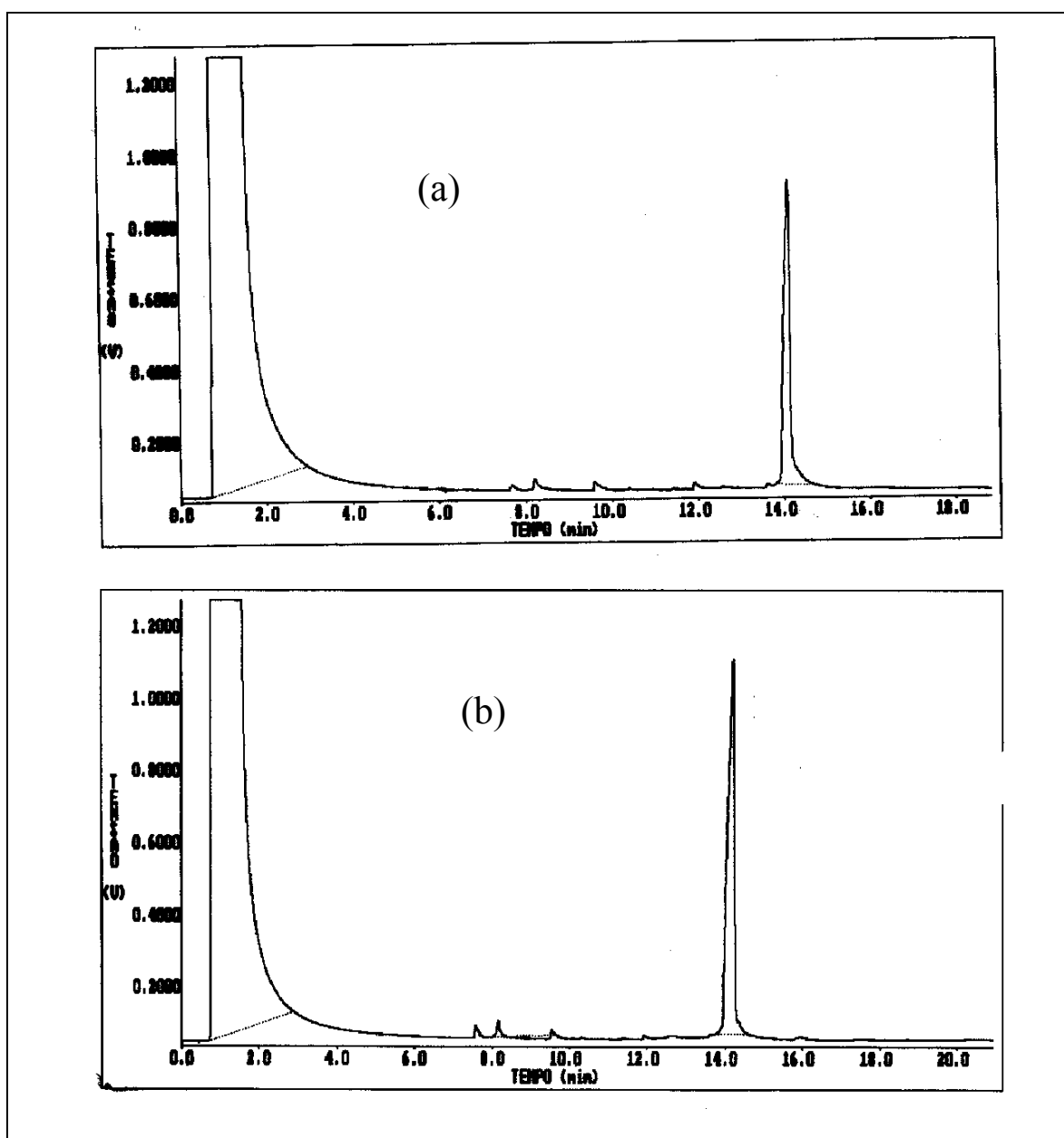


Figura 86 - Cromatograma do poligodial em benzeno sob refluxo (a) início da reação (b) após uma hora de reação

### 5.5. PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS EXTRATOS CHCl<sub>3</sub> DAS CASCAS, CAULES E FOLHAS DE *D. brasiliensis*

Os extratos das cascas, caules e folhas de *D. brasiliensis* apresentaram diferenças nos ensaios antifúngicos e alelopáticos. Estes dados indicam a presença de metabólitos diferentes nas distintas partes da planta. Na tentativa de verificar a existência de metabólitos diferentes, determinou-se o perfil cromatográfico por cromatografia à gás das frações mais apolares dos distintos extratos CHCl<sub>3</sub>. Utilizou-se este método devido estes extratos serem constituídos de compostos de baixa polaridade e por serem úteis para a padronização de extratos vegetais.<sup>110</sup>

Na fig. 87 estão mostrados os cromatogramas dos extratos CHCl<sub>3</sub> das cascas, caules e folhas de *D. brasiliensis*. No cromatograma A, observa-se um pico com tempo de retenção em 14.74 min. referente ao poligodial (**8**), que foi identificado por comparação com uma amostra autêntica. Este composto é o majoritário neste extrato. Nos caules, cromatograma B, observa-se resíduo de poligodial e nas folhas, cromatograma C, ele não é encontrado. Da mesma maneira, pode ser observado nos 3 cromatogramas outros sinais que são distintos em determinadas partes.

No estudo fitoquímico realizado com estes extratos, constatou-se a presença dos sesquiterpenos drimanos somente nas cascas, já nos caules foram encontrados álcoois e ácidos graxos. Nas folhas, além dos álcoois e ácidos graxos foi isolada uma lignana.

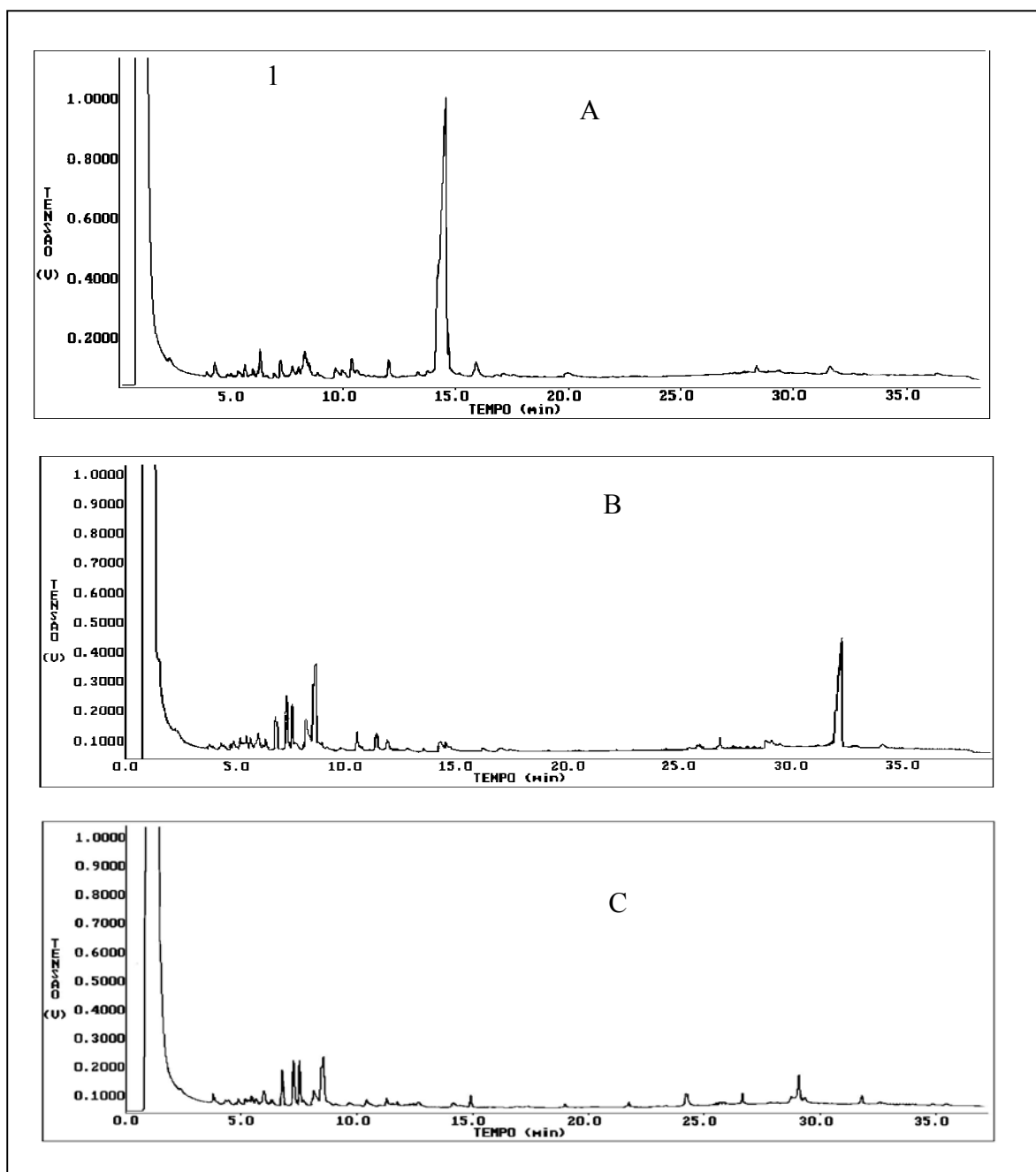


Figura 87 - Cromatograma das diferentes partes do extrato  $\text{CHCl}_3$  de *Drimys brasiliensis* (A cascas, B caules, C folhas, 1 poligodial (8))

### 5.5.1. PERFIL CROMATOGRÁFICO DE FRAÇÕES DO EXTRATO $\text{CHCl}_3$ DAS CASCAS DE *D. brasiliensis*

O extrato  $\text{CHCl}_3$  das cascas de *D. brasiliensis* foi fracionado em coluna de sílica gel, eluída com hexano e gradualmente enriquecida com ACOEt e etanol, as frações foram reunidas de acordo com as semelhanças observadas por c.c.d. As frações DB  $\text{CHCl}_3$  1-15, 16-18 e 19-25, foram submetidas a análises por CG/EM na tentativa de se determinar possíveis drimanos. O modo de fragmentação que freqüentemente é observado para os drimanos pode ser observado na Fig. 88. Foi observado em alguns espectros de massas fragmentos intensos em  $m/z$  124 e 109. Outros espectros apresentam os sinais em  $m/z$  121 e 109. A fragmentação em  $m/z$  121 $[\text{C}_9\text{H}_{13}]$  é característica de terpenos. O fragmento em  $m/z$  124 pode ser formado a partir de uma quebra semelhante a uma reação retro Diels-Alder. Isto parece ocorrer quando o drimano não contém grupamentos aldeídicos. Já para aqueles que contêm, o fragmento em  $m/z$  121 parece ser preferido.

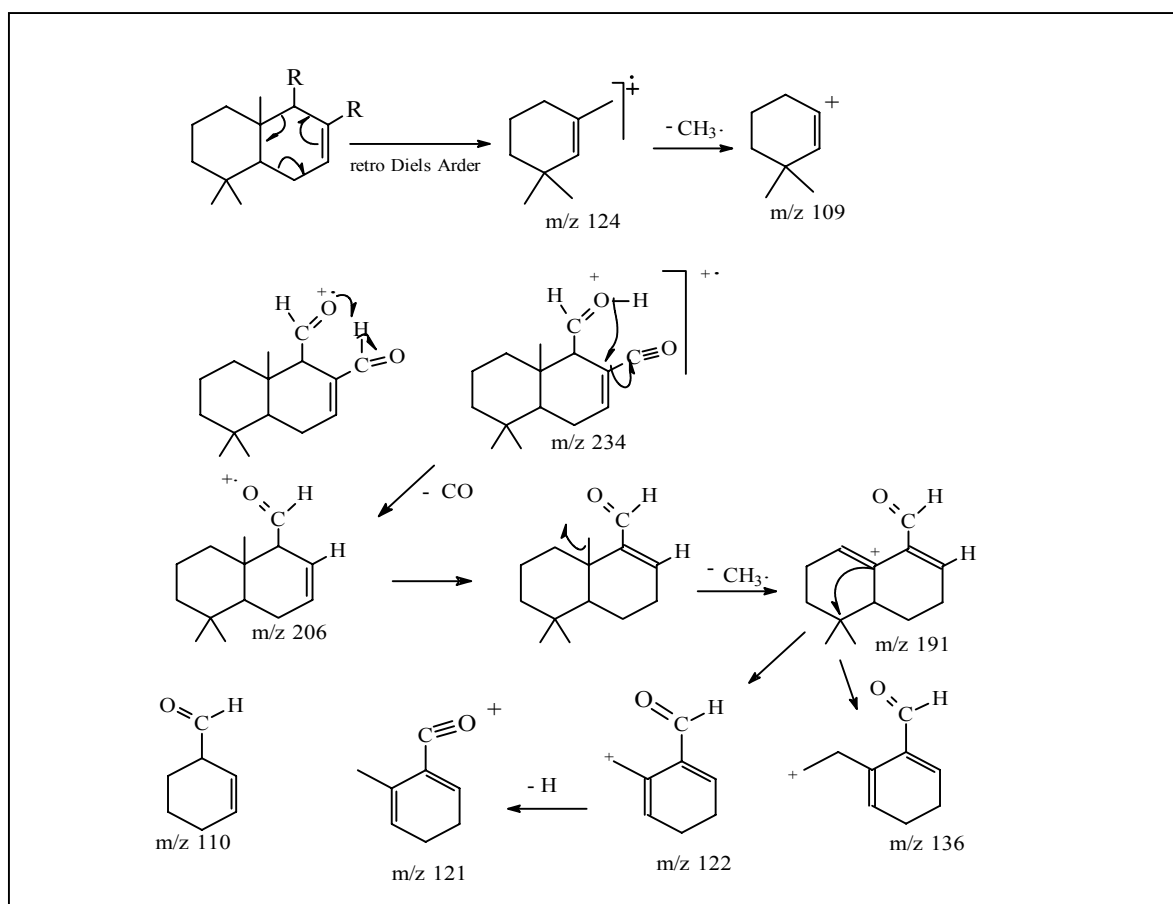


Figura 88 – Fragmentações observadas em drimanos



Na Fig. 89 está apresentado o cromatograma da fração BD  $\text{CHCl}_3$  1-15, pela análise dos espectros de massas obtidos (espectros não mostrados), não se observaram as fragmentações características de drimanos.

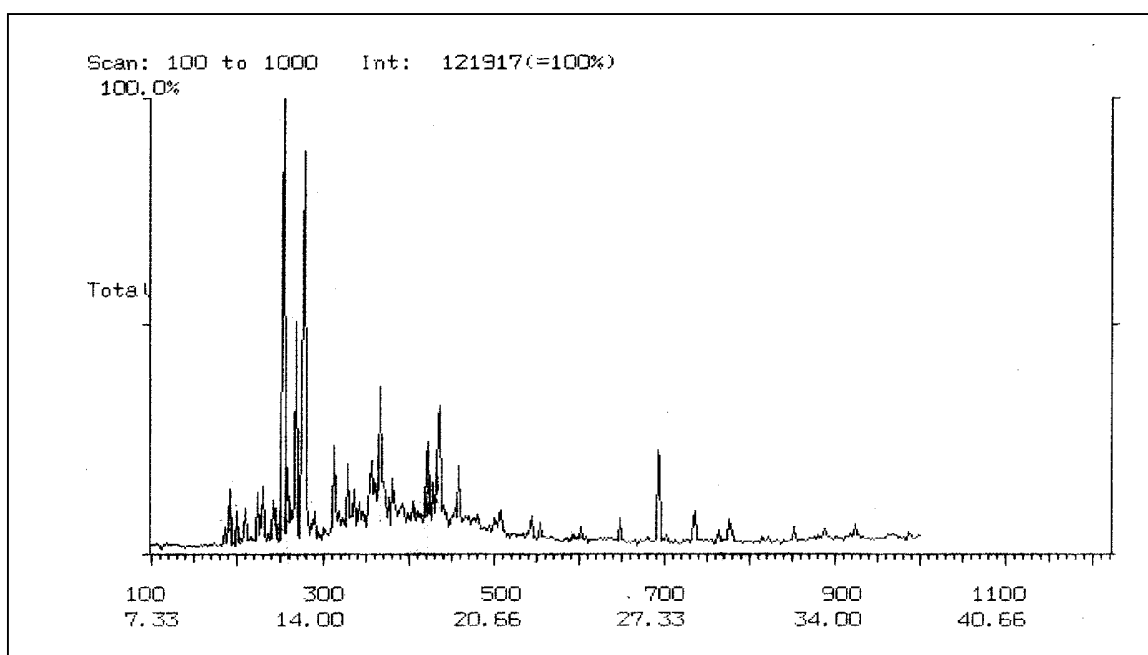


Figura 89 – Cromatograma da fração DB  $\text{CHCl}_3$  1-15

Na Fig. 90 está apresentado o cromatograma da fração DB  $\text{CHCl}_3$  16-18. Pela análise dos espectros de massas obtidos, observam-se fragmentações que podem ser atribuídas ao esqueleto drimânico a partir do tempo de retenção de 15,60 até 23,03 min. Nas Figuras 91-93 estão apresentados os espectros de massas obtidos neste intervalo. Os espectros de massas obtidos, foram comparados com alguns espectros de drimanos, onde, pode-se observar no tempo de retenção de 17,83 min. a presença de drimenol (**12**), este drimano já havia sido isolado das cascas de *D. angustifolia*.<sup>46-51</sup> No trabalhos fitoquímicos não conseguimos purificá-lo.

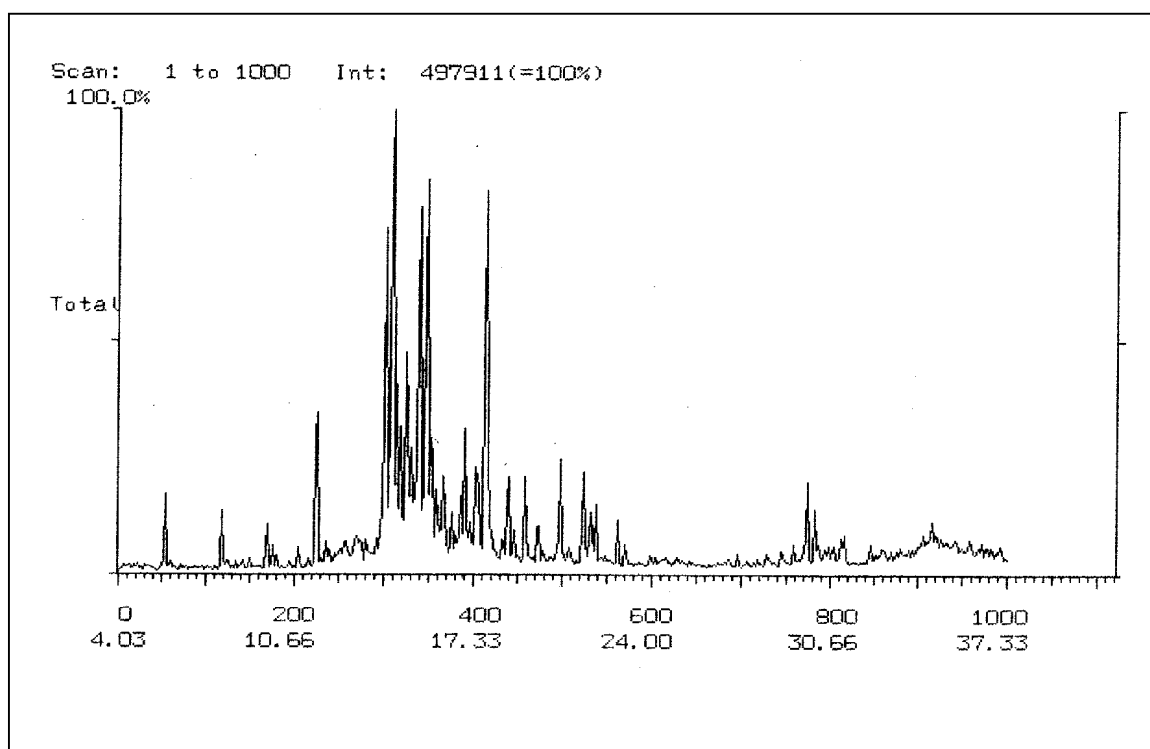


Figura 90 - Cromatograma da fração DB  $\text{CHCl}_3$  16-18

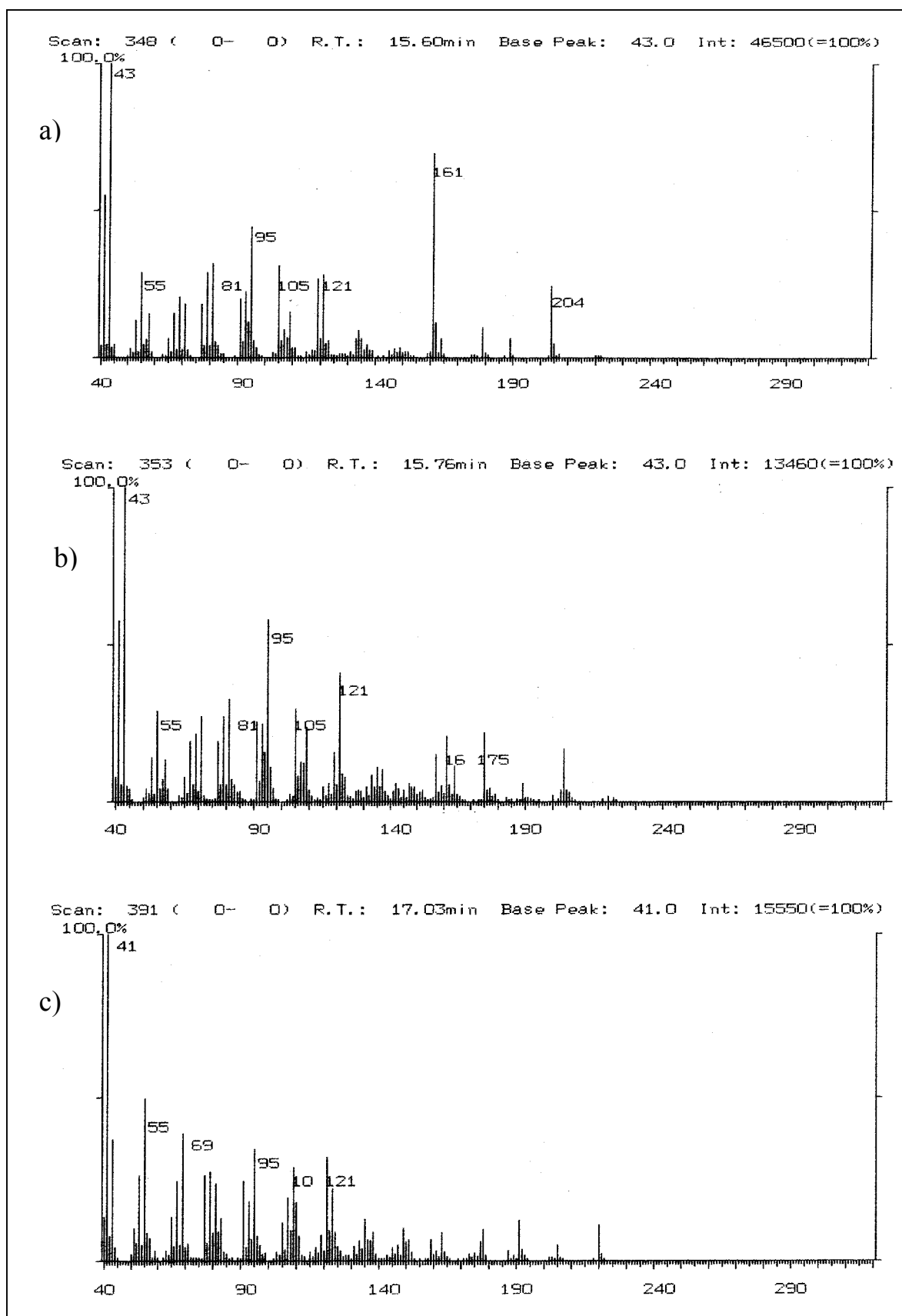


Figura 91 – Espectros de massas obtidos da fraçãoDB  $\text{CHCl}_3$  16-18 a) Tr 15,60 min, b) Tr 15,75 min, c) Tr 17,03 min

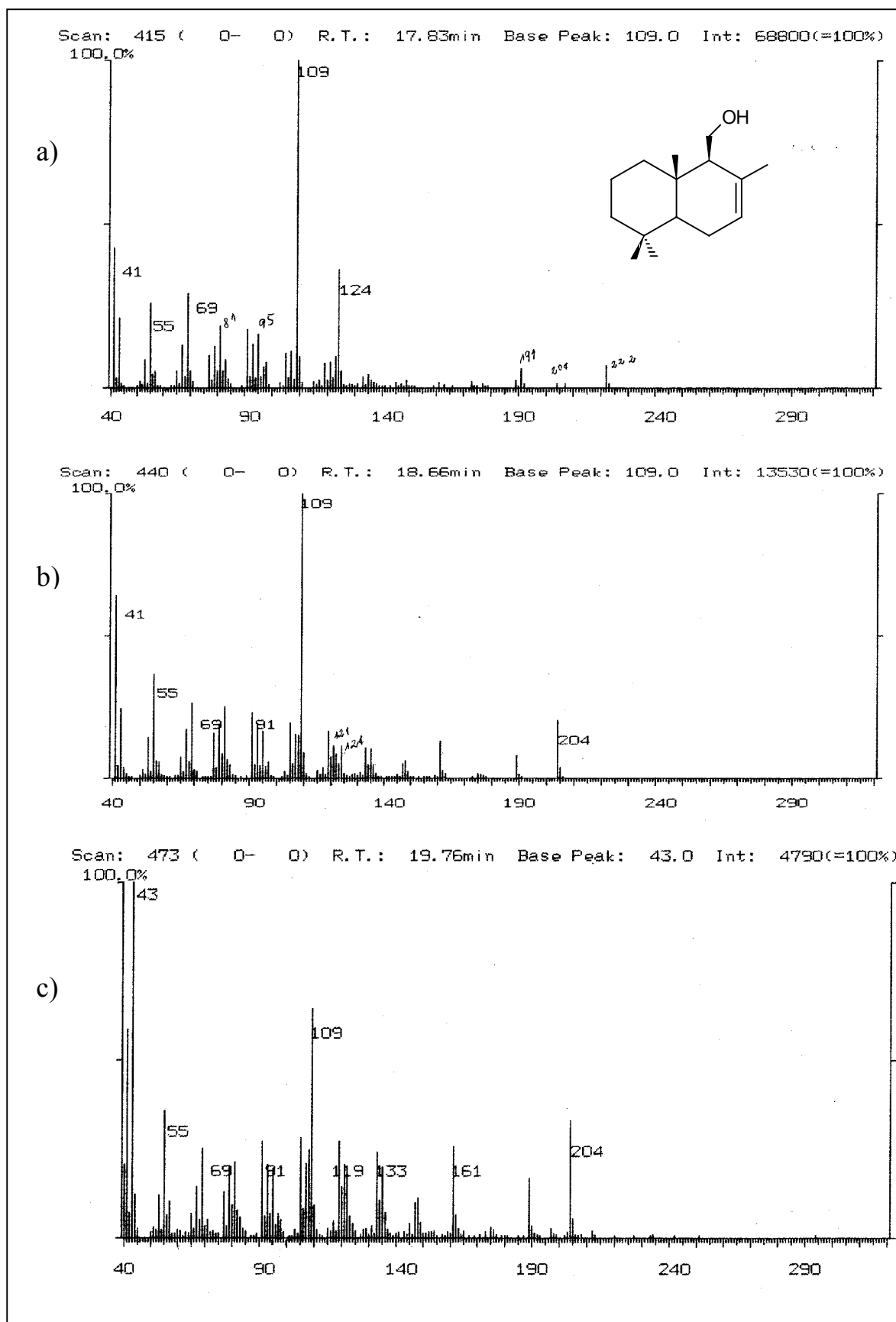


Figura 92 – Espectros de massas obtidos da fração DB  $\text{CHCl}_3$  16-18 a) Tr 17,83 min, b) Tr 18,66 min, c) Tr 19,76 min

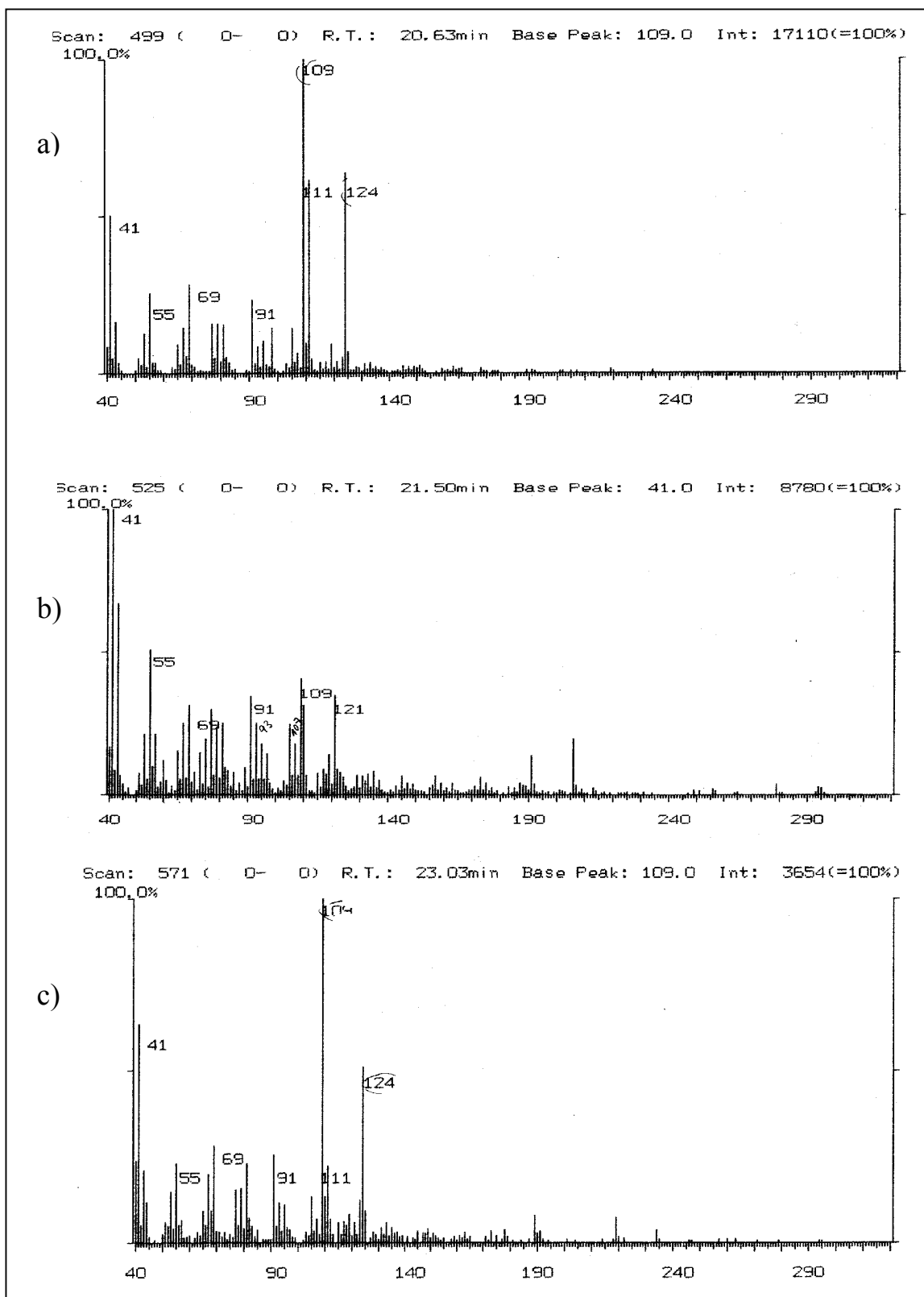


Figura 93 – Espectros de massas obtidos da fraçãoDB  $\text{CHCl}_3$  16-18 a) Tr 20,63 min, b) Tr 21,50 min, c) Tr 23,03 min

No cromatograma da fração DB  $\text{CHCl}_3$  19-25 (Fig. 94), observam-se sinais que podem corresponder aos drimanos a partir de 15,53 até 24,13 min., também se observa a presença de drimenol em 17,83 min. Os espectros de massas obtidos em 19,46, 21,76, 21,93 e 22,0 min. são todos semelhantes e semelhantes ao do poligodial, por comparação dos tempos de retenção obtidos para o poligodial e isopoligodial, pode-se sugerir que o composto com tempo de retenção de 19,46 min. seja o isopoligodial e em 22,0 min. o poligodial (Fig. 95-98).

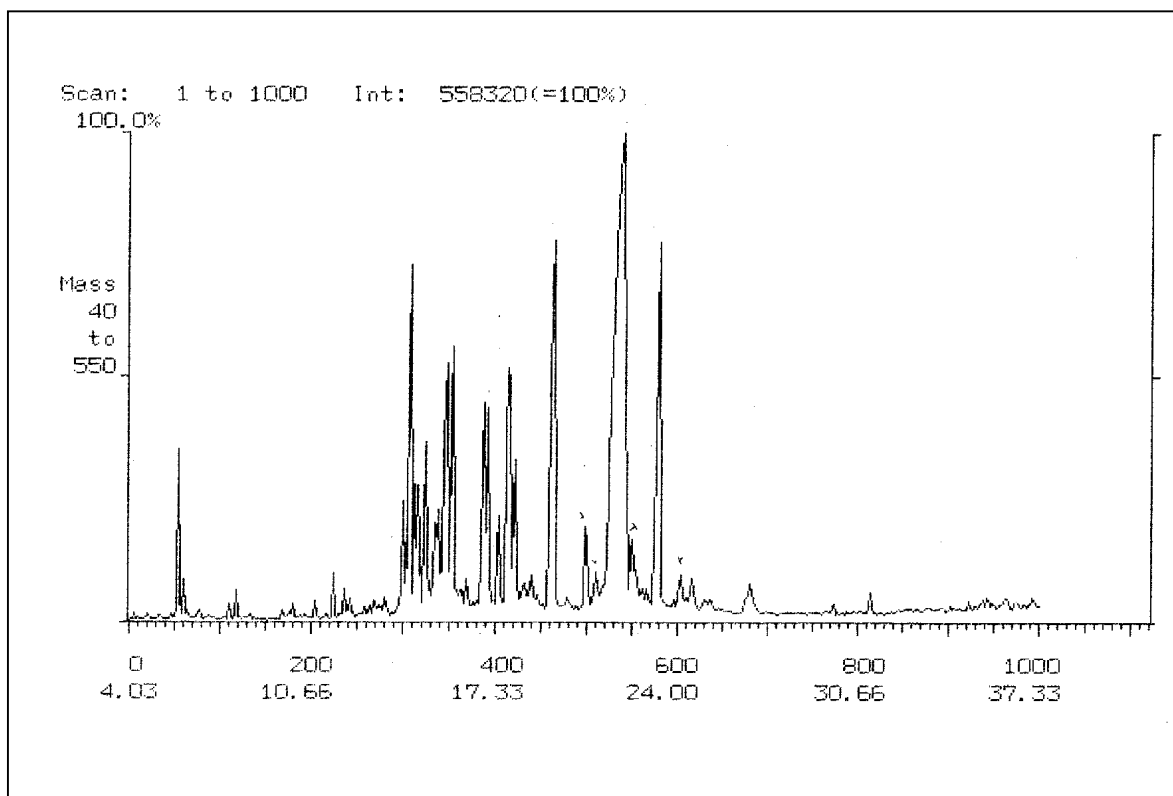


Figura 94 - Cromatograma da fração DB  $\text{CHCl}_3$  19-25

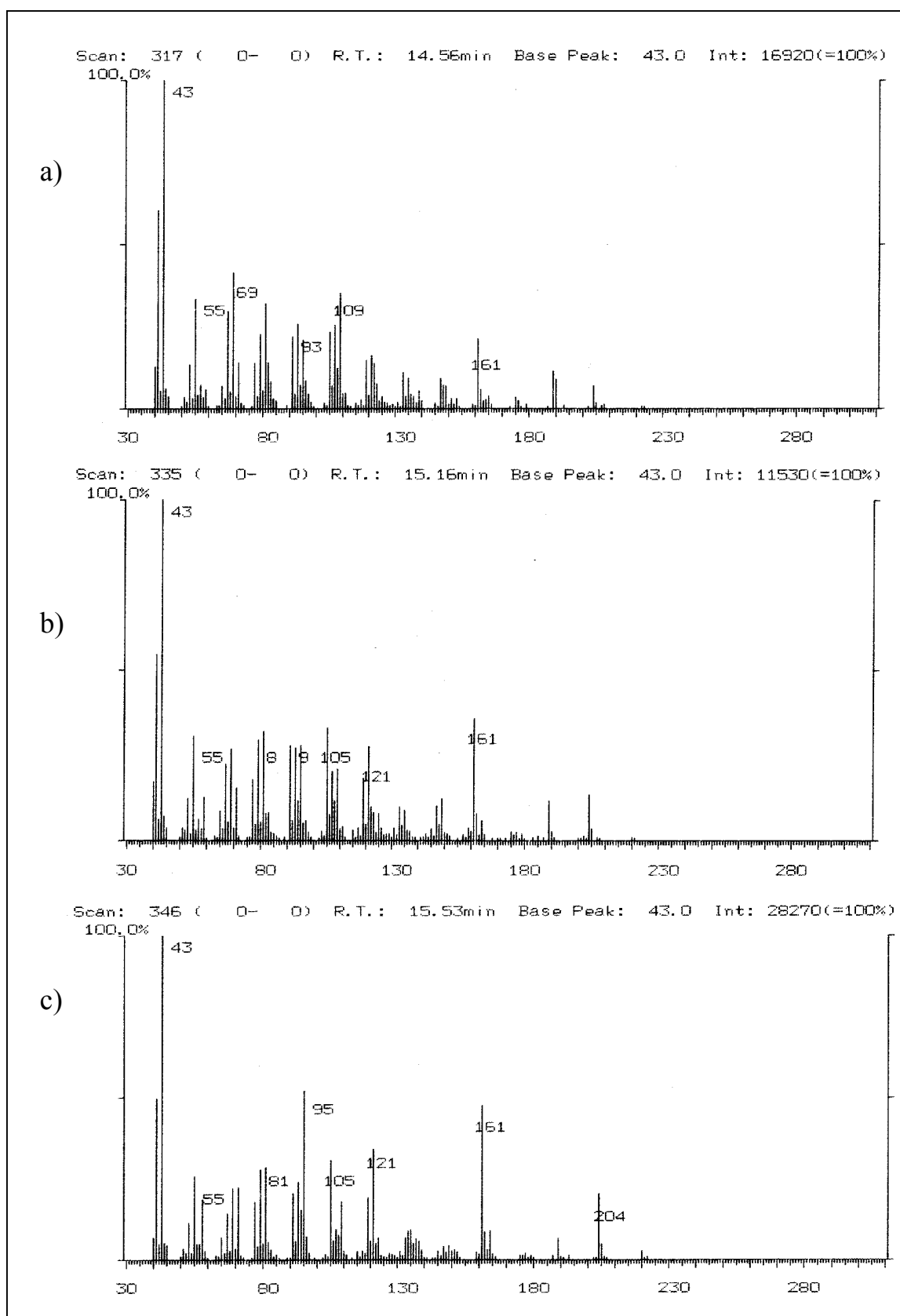


Figura 95 – Espectros de massas obtidos da fraçãoDB CHCl<sub>3</sub> 19-25 a) Tr 14,56 min, b) Tr 15,16 min, c) Tr 15,53 min

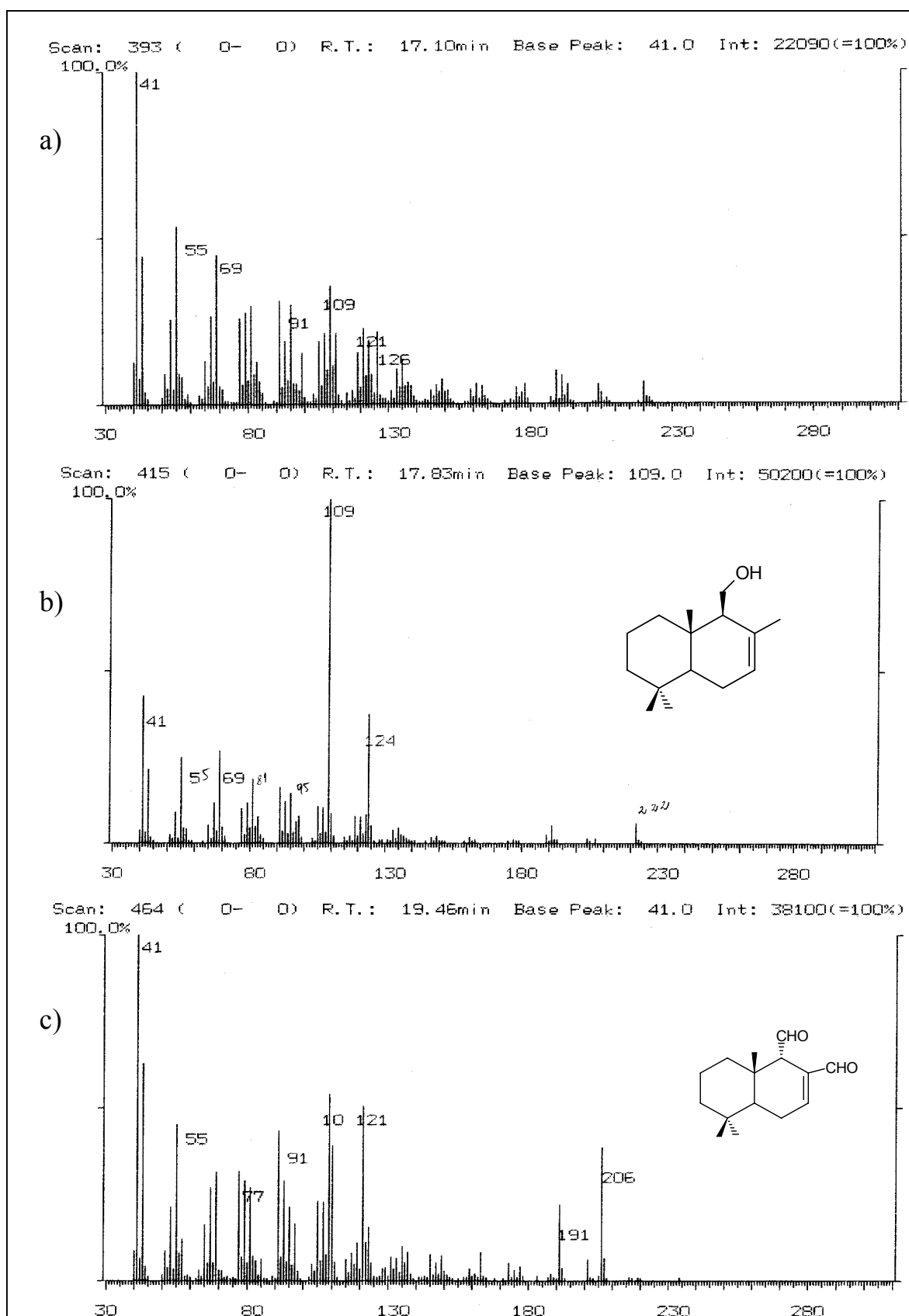


Figura 96 – Espectros de massas obtidos da fraçãoDB CHCl<sub>3</sub> 19-25 a) Tr 17,10 min, b) Tr 17,83 min, c) Tr 19,46 min



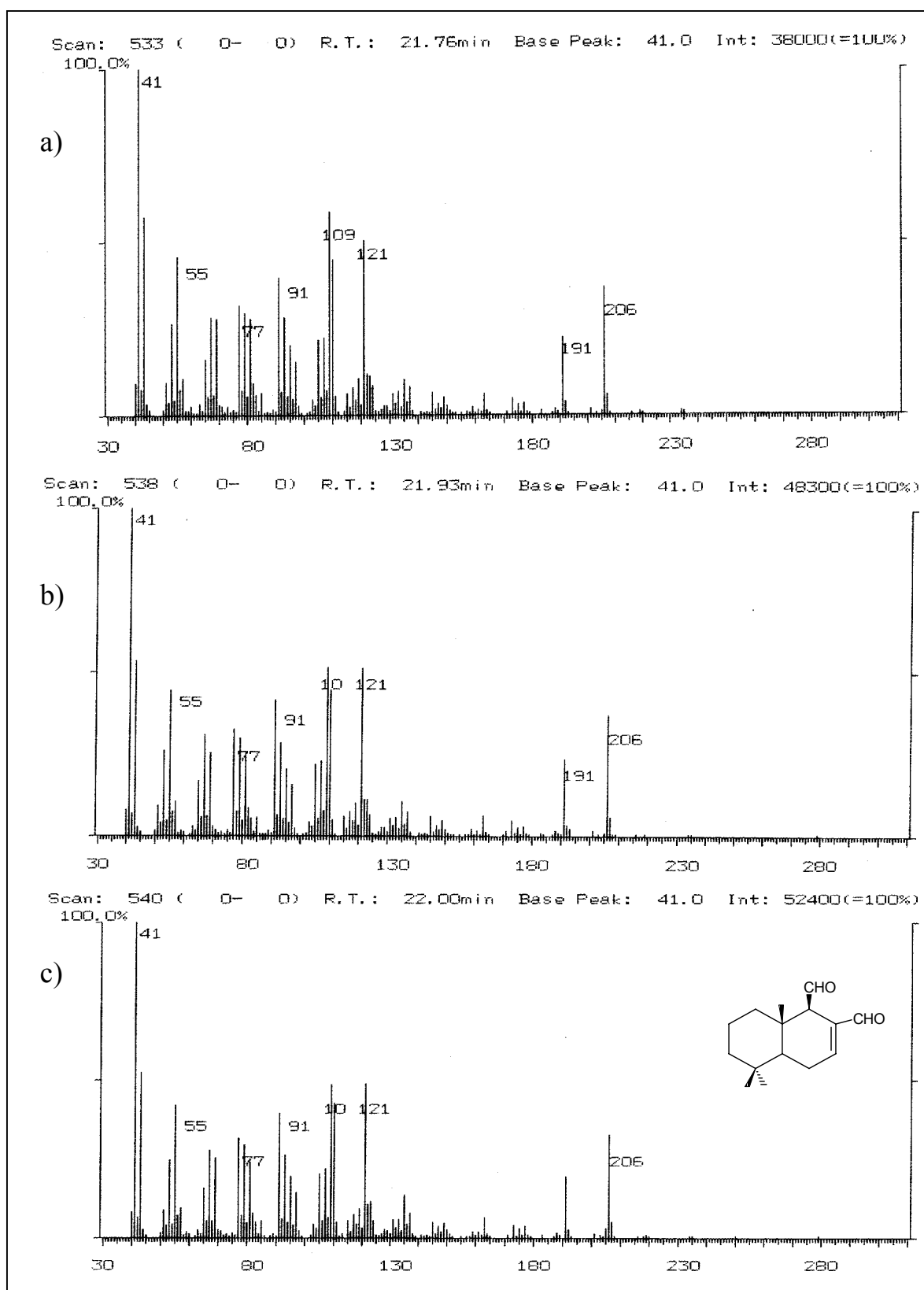


Figura 97 – Espectros de massas obtidos da fraçãoDB CHCl<sub>3</sub> 19-25 a) Tr 21,76 min, b) Tr 21,93 min, c) Tr 22,00 min

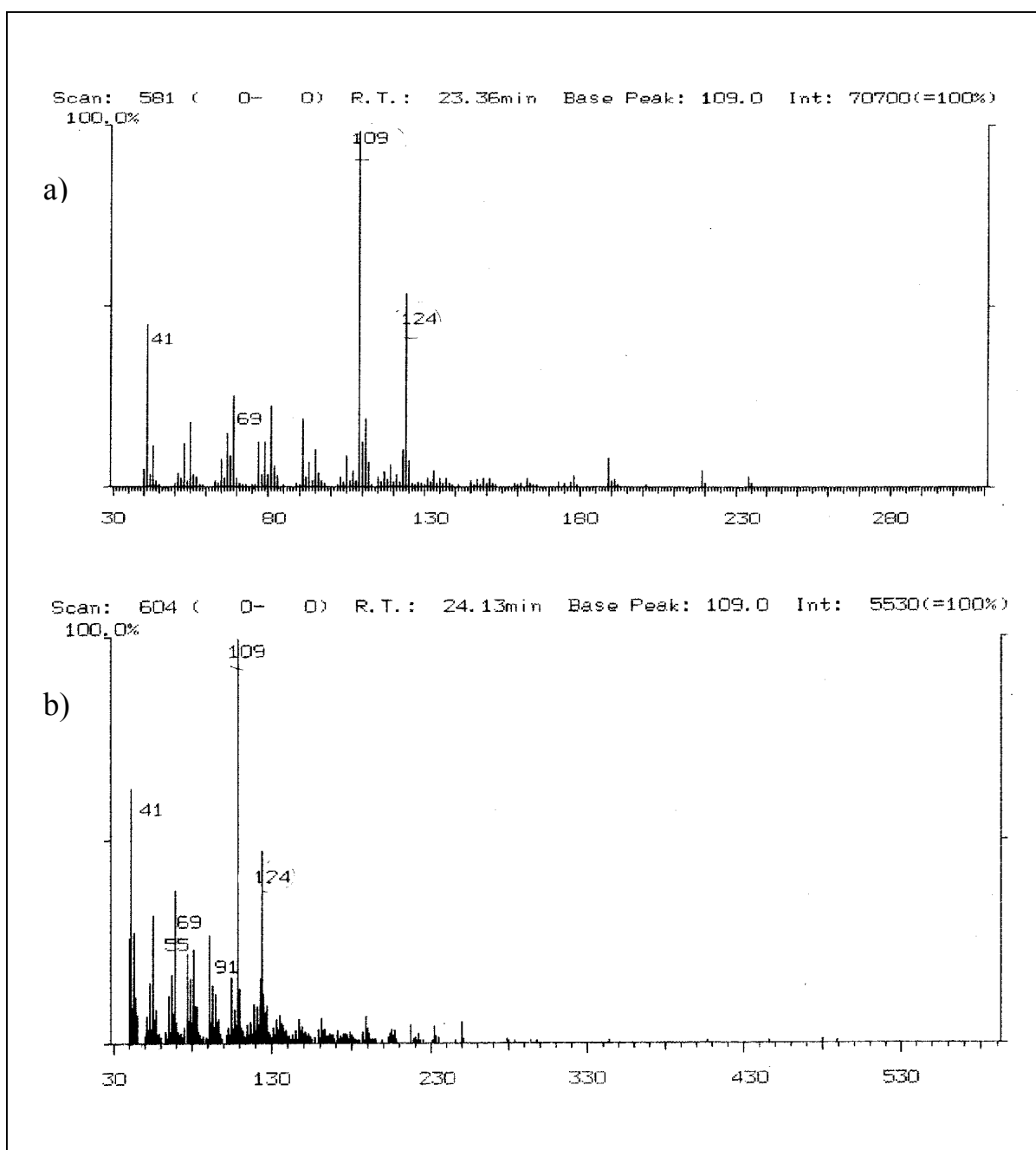


Figura 98 – Espectros de massas obtidos da fraçãoDB CHCl<sub>3</sub> 19-25 a) Tr 23,36 min, b) Tr 24,13 min

### 5.5.2. PERFIL CROMATOGRÁFICO DE FRAÇÕES DO EXTRATO $\text{CHCl}_3$ DAS FOLHAS DE *D. brasiliensis*

O extrato  $\text{CHCl}_3$  das folhas de *D. brasiliensis* foi fracionado em coluna de sílica gel, eluída com hexano e gradualmente enriquecida com ACOEt e EtOH, as frações foram reunidas de acordo com as semelhanças observadas por c.c.d. A fração DBF  $\text{CHCl}_3$  1-12 foi submetida à análise por CG/EM, o cromatograma obtido (Fig. 99) possui picos com tempo de retenção somente a partir de 22,0 min. Os espectros de massas obtidos não possuem as fragmentações características dos drimanos. Nesta fração observou-se nos espectros obtidos nos tempos de retenção de 22,76, 24,46, 24,90, 26,60, 26,85, 28,53, 28,70, 30,36 e 32,33 min. padrões de fragmentação semelhantes, parecem isômeros, conforme um exemplo apresentado na fig. 100.

O composto majoritário nesta fração encontra-se no tr de 34,03 min, trata-se de um ácido graxo, como pode ser observado pelos espectros de massas (Fig. 101) e Infra Vermelho do composto purificado (Fig. 102).

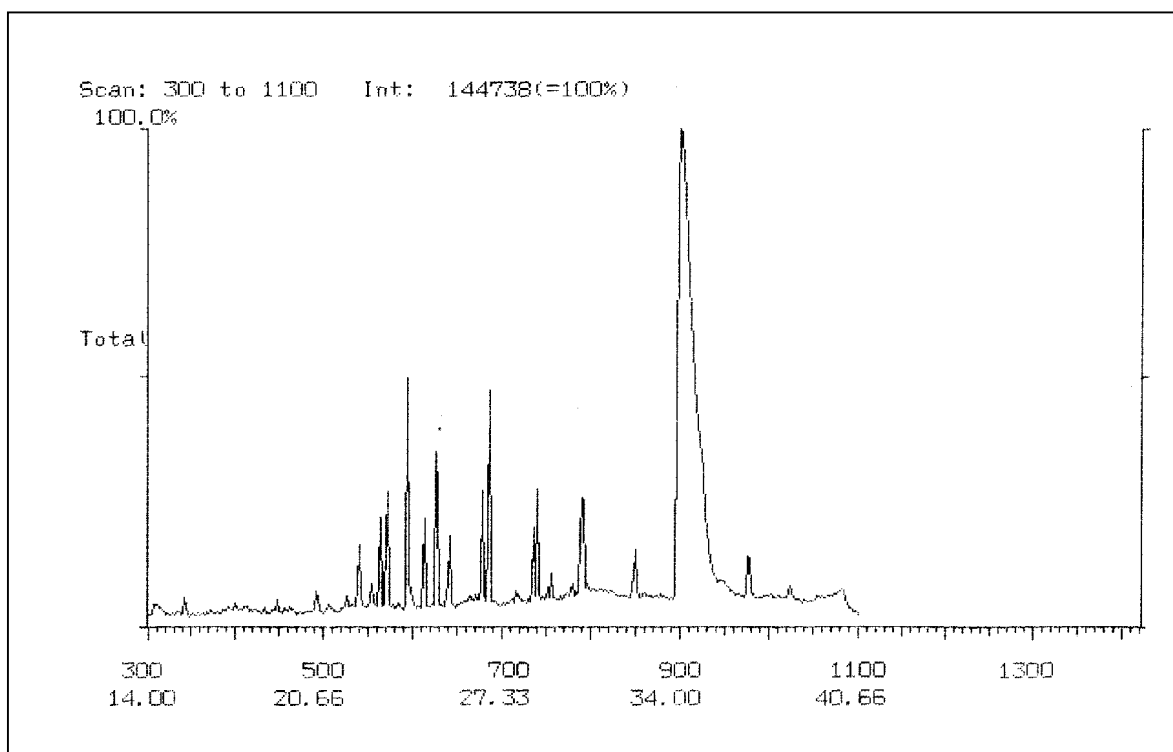


Figura 99 - Cromatograma da fração DBF  $\text{CHCl}_3$  1-12

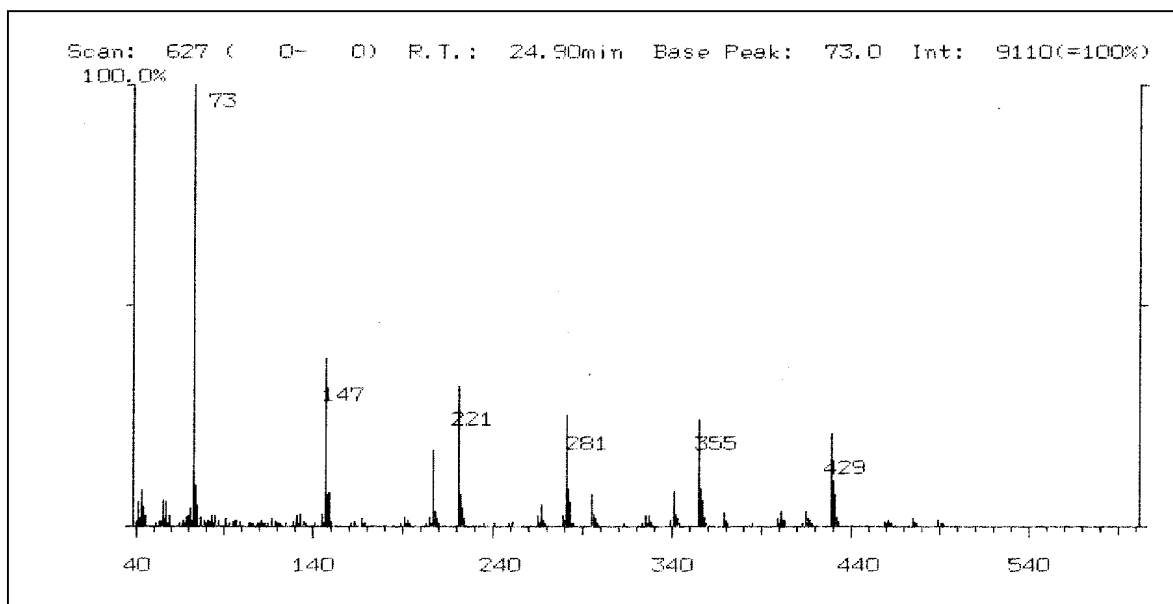


Figura 100 - Espectros de massas obtidos da fração DBF  $\text{CHCl}_3$  1-12 tr 24,90 min.

Na Fig. 101 os fragmentos em  $m/z$  43, 57, 69, 83, 97 e 111 correspondem a perda de grupos  $\text{CH}_2$  resultante de quebras sucessivas de C-C originando íons alquila.

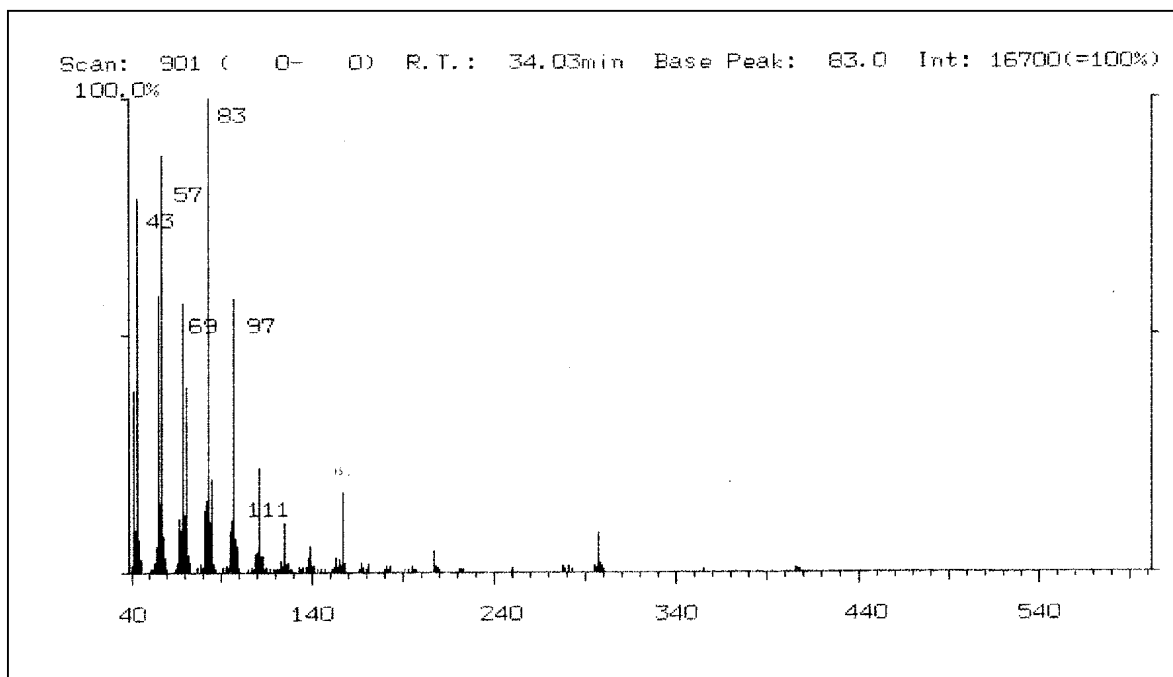


Figura 101 – Espectros de massas obtidos da fração DBF  $\text{CHCl}_3$  1-12 tr 34,03 min.

No espectro de IV (Fig. 102) observam-se absorções referentes a deformações axiais de OH em  $3328\text{ cm}^{-1}$ , C=O em  $1734\text{ cm}^{-1}$ , C-H em  $2918$  e  $2848\text{ cm}^{-1}$ .

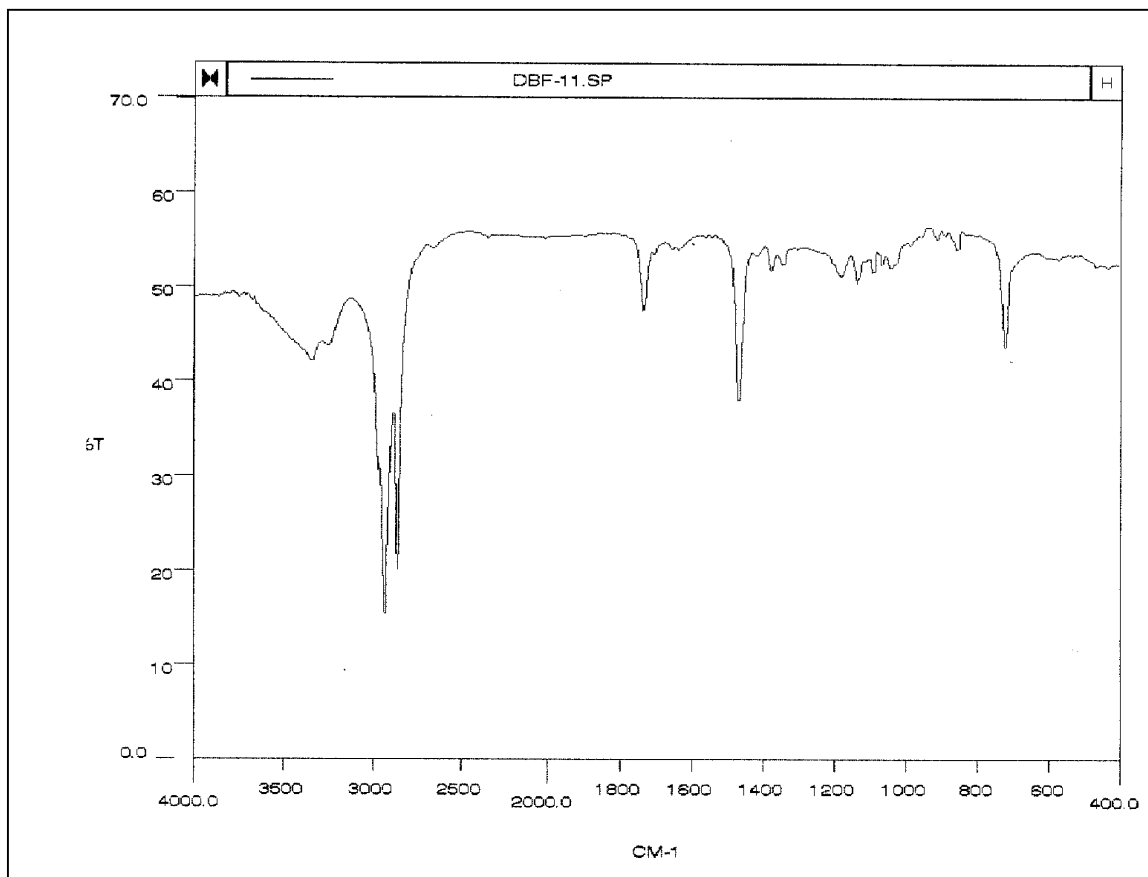


Figura 102 – Espectro no IV (pastilha de KBr) do composto purificado da fração DBF – 1-12

A fração DBF  $\text{CHCl}_3$  13-14 é constituída por somente dois compostos, como pode ser observado no cromatograma (Fig. 103). Pelos espectros de massas (Fig. 104) observam-se fragmentações correspondentes a quebras sucessivas de C-C em  $m/z$  43, 57, 69, 83, 97, 111 no primeiro espectro e em  $m/z$  43, 57, 71 e 85, no segundo espectro. No espectro no IV da mistura (Fig. 105) são observadas absorções referentes a deformação axial de OH em  $3328\text{ cm}^{-1}$ , C=O em  $1734\text{ cm}^{-1}$  e C-H em  $2918$  e  $2848\text{ cm}^{-1}$ . Estes dados também sugerem que estes compostos sejam ácidos graxos.

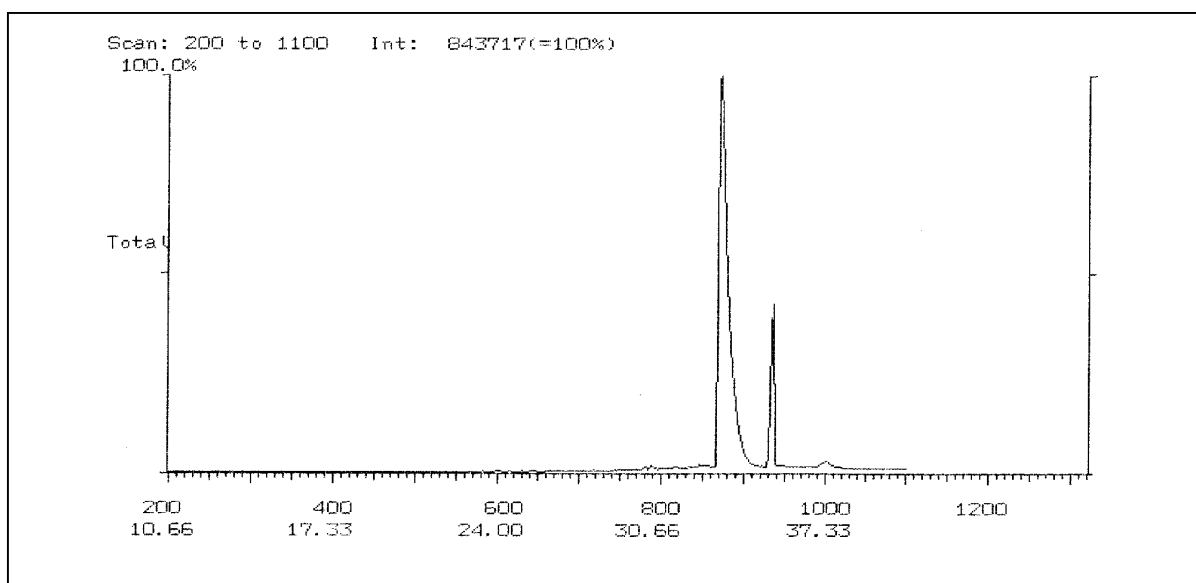


Figura 103 – Cromatograma da fração DBF  $\text{CHCl}_3$  13-14

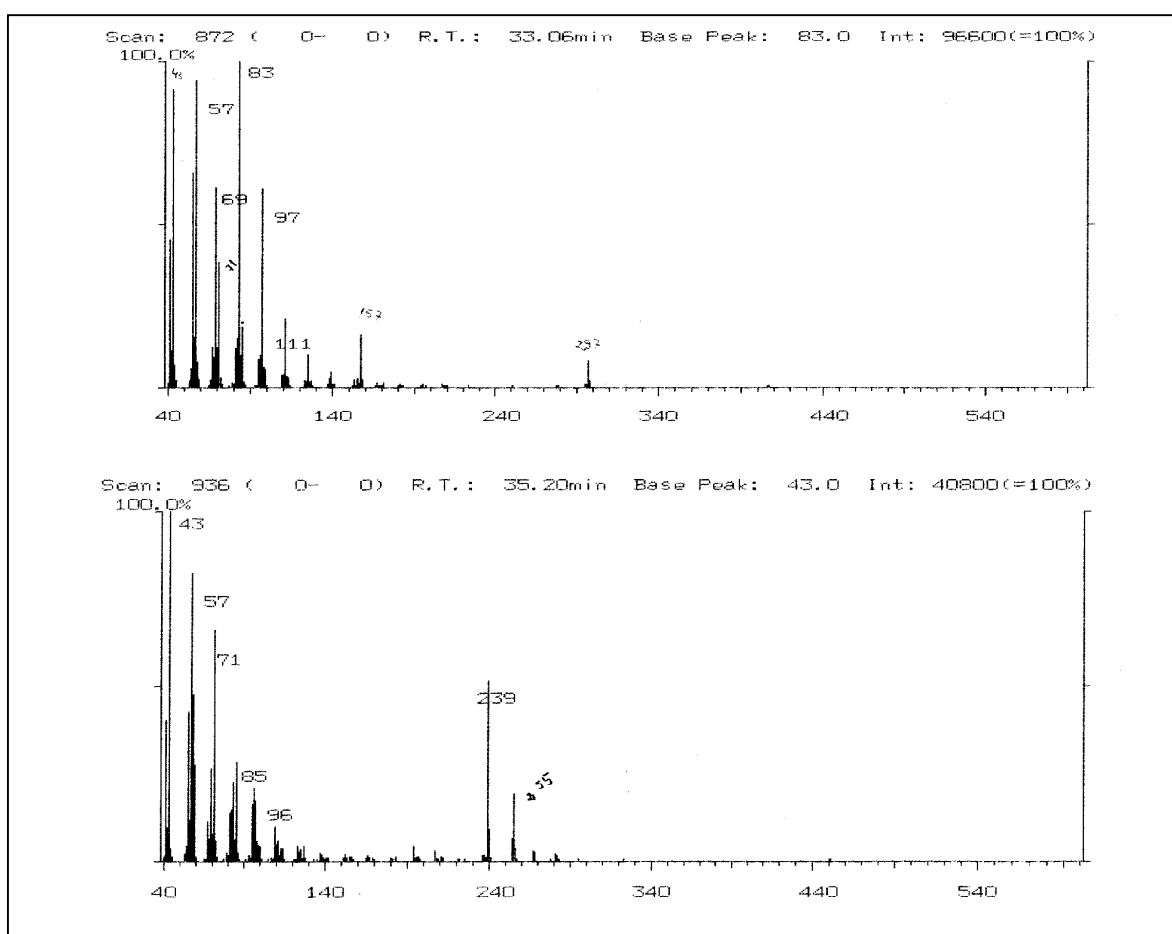


Figura 104 – Espectro de massas da fração DBF  $\text{CHCl}_3$  13-14 a) Tr 33,06 min  
b) 35,20 min

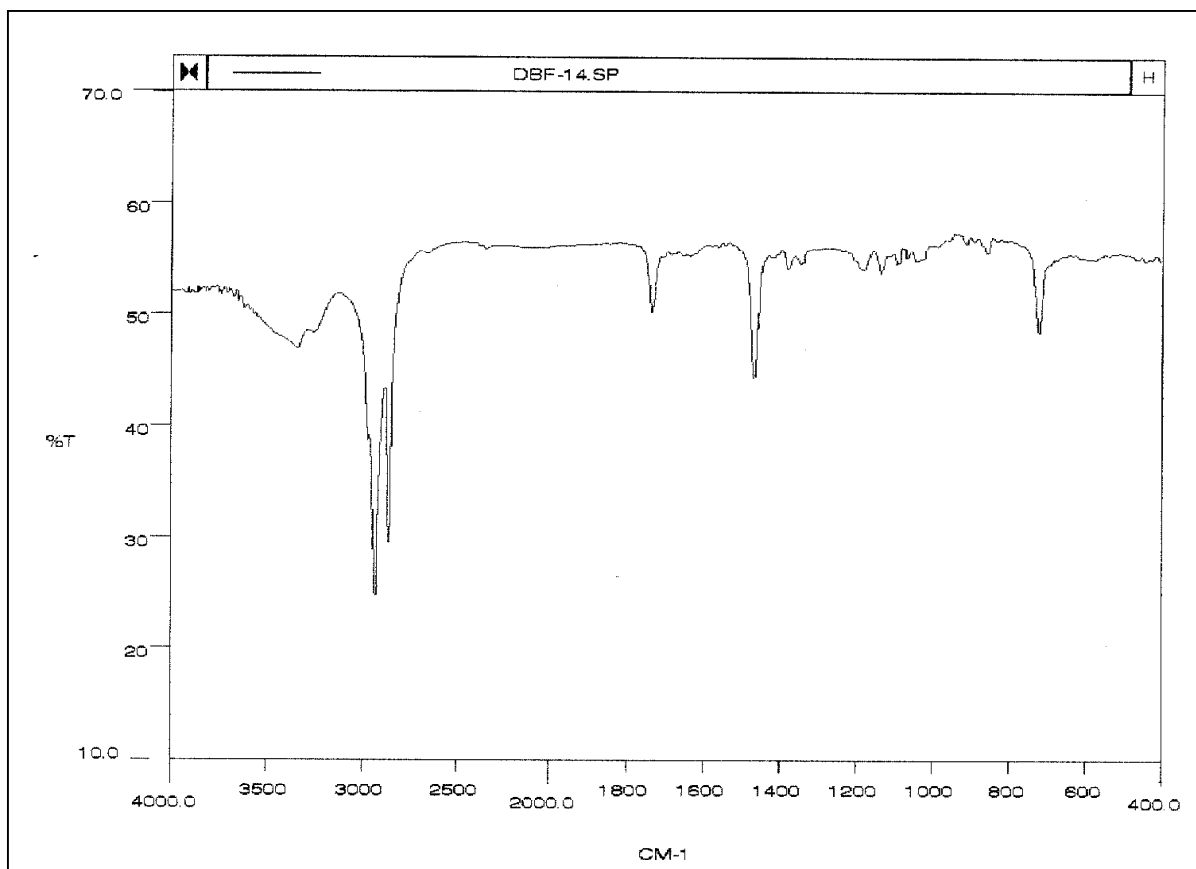


Figura 105 – Espectro no IV (pastilha de KBr) da fração DBF  $\text{CHCl}_3$  13-14

No espectro no IV da fração DBF  $\text{CHCl}_3$  15-18 (Fig. 106) observam-se absorções referentes à OH,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$  e  $\text{C}=\text{O}$ , sugerindo que seja um ácido graxo. A fração DBF  $\text{CHCl}_3$  19-33 parece ser de um álcool graxo, pois no espectro de IV (Fig. 107) não se observa a absorção de  $\text{C}=\text{O}$ .

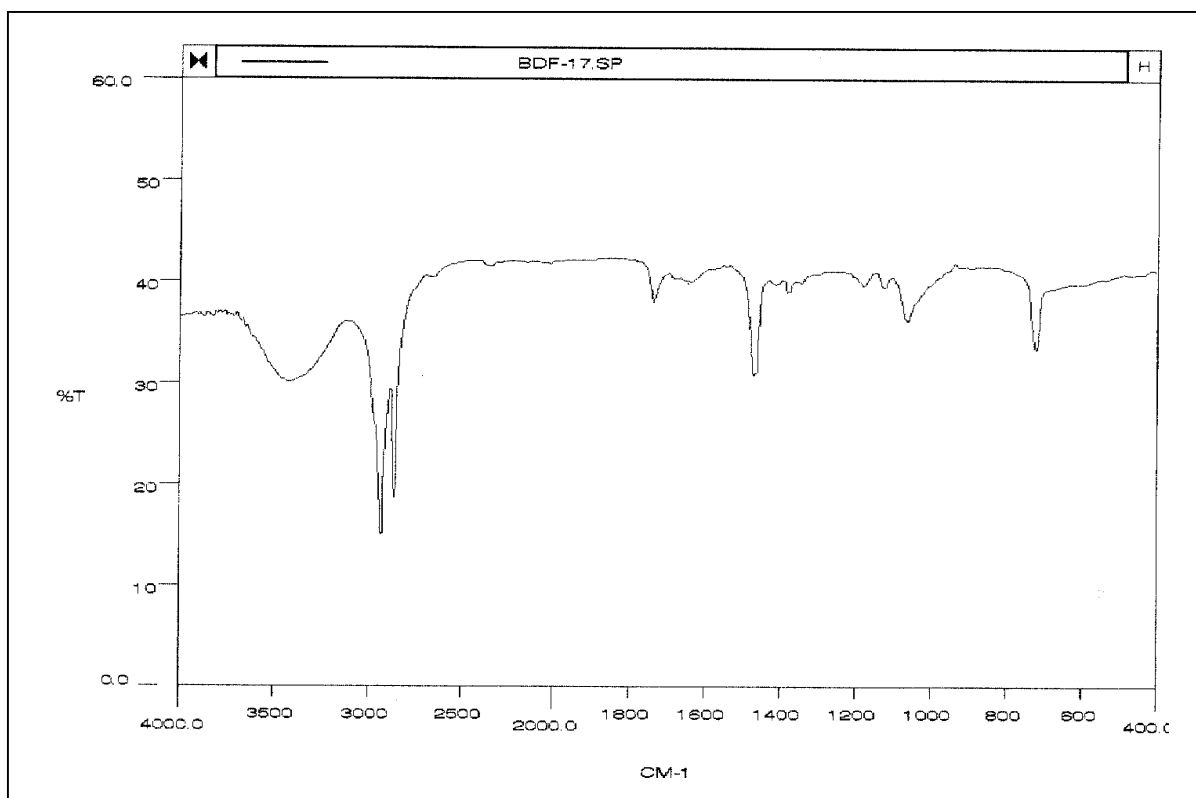


Figura 106 – Espectro no IV (pastilha de KBr) da fração DBF  $\text{CHCl}_3$  15-18

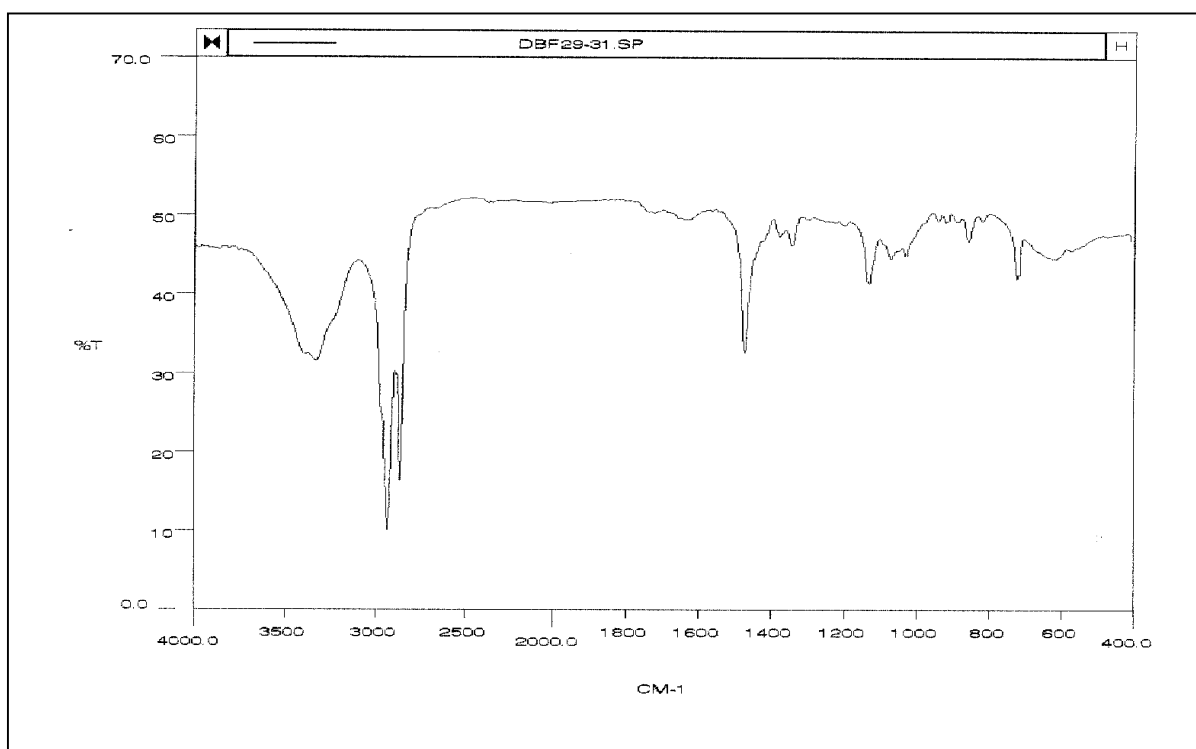


Figura 107 - Espectro no IV (pastilha de KBr) da fração DBF  $\text{CHCl}_3$  19-33



## 5.6. ATIVIDADE BIOLÓGICA

A química de produtos naturais toma sentido especial quando está inter-relacionada com a atividade biológica. A escolha da planta é, na maioria das vezes, direcionada pelos estudos biológicos. A composição química pode variar nas distintas partes da planta, por isso os ensaios podem direcionar o estudo químico para as partes ou frações de interesse.

Os extratos e compostos purificados das plantas estudadas neste trabalho foram testados com relação à atividade alelopática, fungicida e antinociceptiva ou analgésica.

### 5.6.1. ATIVIDADE ALELOPÁTICA

A atividade alelopática pode ser avaliada através de ensaios de germinação de sementes e posteriormente seu crescimento e desenvolvimento. Avalia-se neste experimento, o comprimento da radícula e do hipocótilo. Visando detectar extratos e possíveis compostos com propriedades alelopáticas, os extratos  $\text{CHCl}_3$  e MeOH das cascas, caules e folhas de *D. brasiliensis* e compostos isolados das cascas foram analisados. Utilizou-se nos experimentos duas sementes alvo: *Lactuca sativa* var. Grand Rapids (alface) obtida comercialmente, com perfil de germinação de 85%, e *Clusia parviflora*, uma planta silvestre, obtida no Campus da Universidade Federal de Santa Catarina.

#### 5.6.1.1. Semente alvo *Lactuca sativa*

##### Ensaio de Germinação

Neste ensaio foram testados os extratos  $\text{CHCl}_3$  e MeOH das cascas, caules e folhas de *D. brasiliensis* nas concentrações de 3000, 1500, 750 e 300 ppm e os compostos DW-1 poligodial (**8**), DW-2 drimanial (**47**), 1- $\beta$ -(p-metoxicinamil)-poligodial (**10**) e uma mistura de DW-1 poligodial (**8**), DW-2 drimanial (**47**) 1:1 nas concentrações de  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-7}$  e  $10^{-9}$ M. Utilizou-se como semente alvo *Lactuca*

*sativa*. Não se observou diferenças no perfil de germinação dos extratos e compostos com relação ao controle nas concentrações analisadas.

### Ensaio de crescimento

No extrato BD  $\text{CHCl}_3$  das cascas (Fig. 108 A, Tab. 19) é observado um aumento de 18% no comprimento da radícula na concentração de 300 ppm, porém a partir de 750 ppm ocorre uma nítida diminuição no comprimento tanto da radícula como do hipocótilo, chegando a inibição de 88 e 76%, respectivamente, a 3000 ppm. Além da variação no comprimento da radícula e hipocótilo, observou-se também uma mudança na morfologia das plântulas, como tortuosidade, mudança de coloração no apse (de branca para marrom) e ausência de pelos absorventes.

No extrato DB MeOH das cascas (Fig. 108 B, Tab. 19) é observado aumento no comprimento da radícula de 50% a partir de 750 ppm, porém ocorre uma diminuição no comprimento do hipocótilo para todas as concentrações.

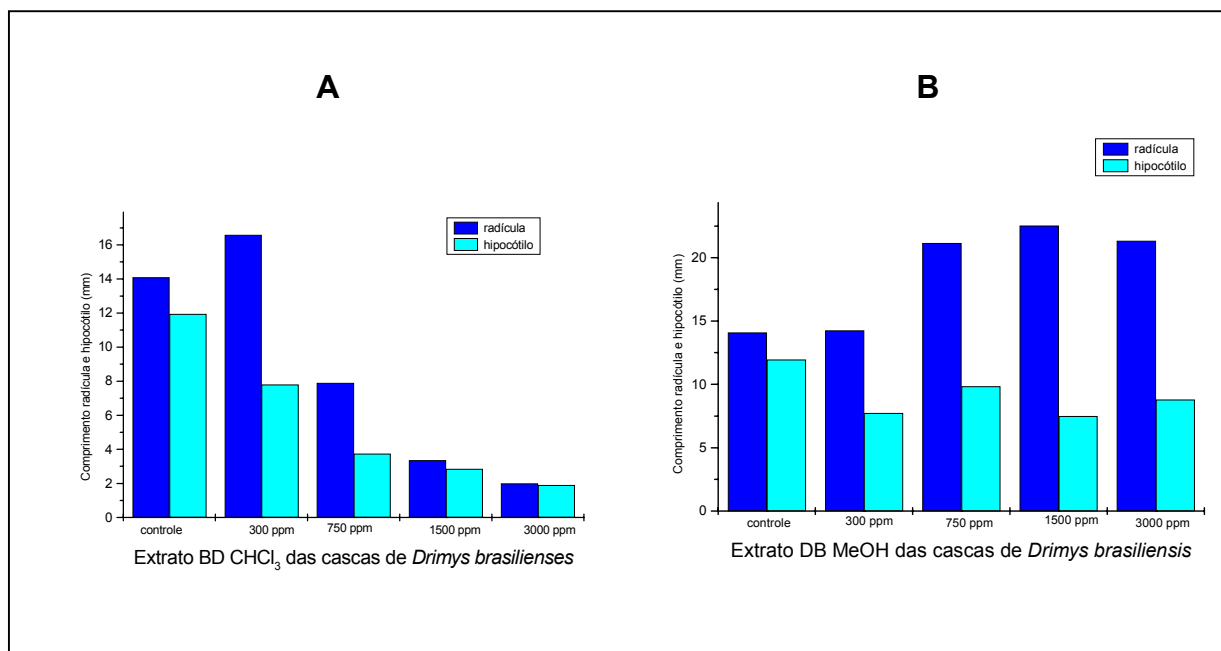


Figura 108 - Ação do extrato DB  $\text{CHCl}_3$  (A) e MeOH (B) das cascas de *Drimys brasiliensis* sobre o crescimento de *lactuca sativa*

Tabela 19 - Efeito dos extratos DB CHCl<sub>3</sub> e MeOH das cascas de *D.brasiliensis* sobre o crescimento da radícula e hipocótilo de *Lactuca sativa*

	Radícula			Hipocótilo		
	%		Desvio	%		Desvio
	crescimento		Padrão	crescimento		Padrão
Extrato DB CHCl <sub>3</sub>						
300 ppm	+ 17,75	*	2,41	- 34,72	***	2,39
750 ppm	- 43,97	***	2,53	- 68,62 <sup>a</sup>	***	1,33
1500 ppm	- 76,12 <sup>a</sup>	***	3,51	- 76,15 <sup>a</sup>	***	0,74
3000 ppm	- 88,05 <sup>a</sup>	***	2,71	- 78,86 <sup>a</sup>	***	4,50
Extrato DB MeOH						
300 ppm	+ 1,17	ns	2,52	- 35,28 <sup>a</sup>	***	3,95
750 ppm	+ 50,0 <sup>a</sup>	***	4,33	- 17,50 <sup>a</sup>	ns	2,51
1500 ppm	+ 59,93 <sup>a</sup>	***	5,13	- 37,24 <sup>a</sup>	***	2,49
3000 ppm	+ 51,41 <sup>a</sup>	***	3,30	- 26,36 <sup>a</sup>	**	1,39

Os valores são apresentados como percentagens em relação ao controle + estímulo, - inibição. Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna, para cada espécie receptora, não diferem entre si pelo teste de Tukey (ns P>0,05; \* P<0,05; \*\* P<0,01; \*\*\* P<0,001).

No extrato DBC CHCl<sub>3</sub> dos caules (Fig. 109 A, Tab. 20) pode ser observado um aumento no comprimento da radícula de 35% a partir de 750 ppm, chegando a 74% em 3000 ppm, que parece ser dependente da concentração. Para a extrato DBC MeOH (Fig. 109 B, Tab. 20) este efeito é observado somente a partir da concentração 1500 ppm. Para os extratos CHCl<sub>3</sub> e MeOH não se observam modificações no hipocótilo.

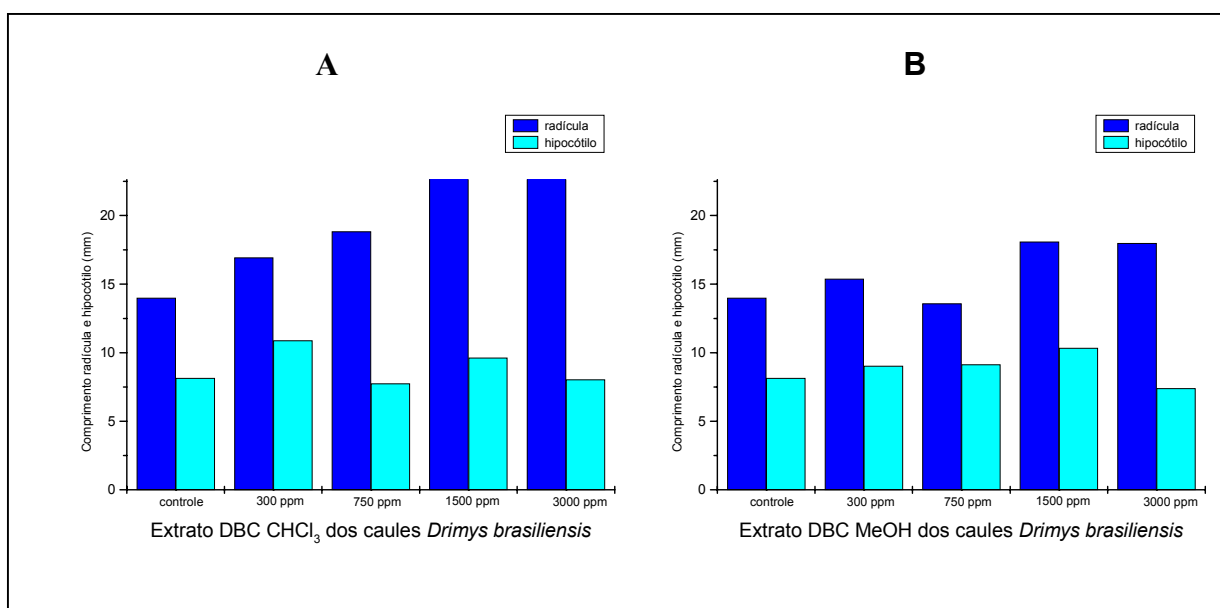


Figura 109 - Ação dos extratos DBC  $\text{CHCl}_3$  (A) e MeOH (B) dos caules de *Drimys brasiliensis* sobre o crescimento de *Lactuca sativa*.

Tabela 20 - Efeito dos extratos DBC  $\text{CHCl}_3$  e MeOH dos caules de *D. brasiliensis* sobre o crescimento da radícula e hipocótilo de *Lactuca sativa*

	Radícula			Hipocótilo		
	%		Desvio	%		Desvio
	crescimento		Padrão	crescimento		Padrão
Extrato DBC $\text{CHCl}_3$						
300 ppm	+ 21,07	ns	3,00	+ 33,74	***	2,29
750 ppm	+ 34,62	***	2,06	- 4,91	ns	1,55
1500 ppm	+ 64,64 <sup>a</sup>	***	4,20	+ 18,40	ns	2,43
3000 ppm	+ 74,29 <sup>a</sup>	***	3,99	- 1,23	ns	1,60
Extrato DBC MeOH						
300 ppm	+ 10,00 <sup>a</sup>	ns	2,70	+ 11,04 <sup>a</sup>	ns	0,82
750 ppm	- 2,85 <sup>a</sup>	ns	2,99	+ 12,26 <sup>a</sup>	ns	1,46
1500 ppm	+ 29,3 <sup>b</sup>	***	3,85	+ 27,00 <sup>a</sup>	***	2,00
3000 ppm	+ 28,5 <sup>b</sup>	**	3,03	- 9,20	ns	1,42

Os valores são apresentados como percentagens em relação ao controle + estímulo, - inibição. Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna, para cada espécie receptora, não diferem entre si pelo teste de Tukey (ns  $P > 0,05$ ; \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ).

Nos extratos DBF  $\text{CHCl}_3$  e MeOH das folhas (Fig. 110 A e B, Tab. 21) pode ser observado um aumento no comprimento da radícula a partir de 750 ppm, chegando 65% para BDF  $\text{CHCl}_3$  e 50% para DBF MeOH. Um aumento no comprimento do hipocótilo é observado nas concentrações de 750 e 1500 ppm no extrato  $\text{CHCl}_3$ , já para o extrato DBF MeOH observa-se uma pequena diminuição nas maiores concentrações.

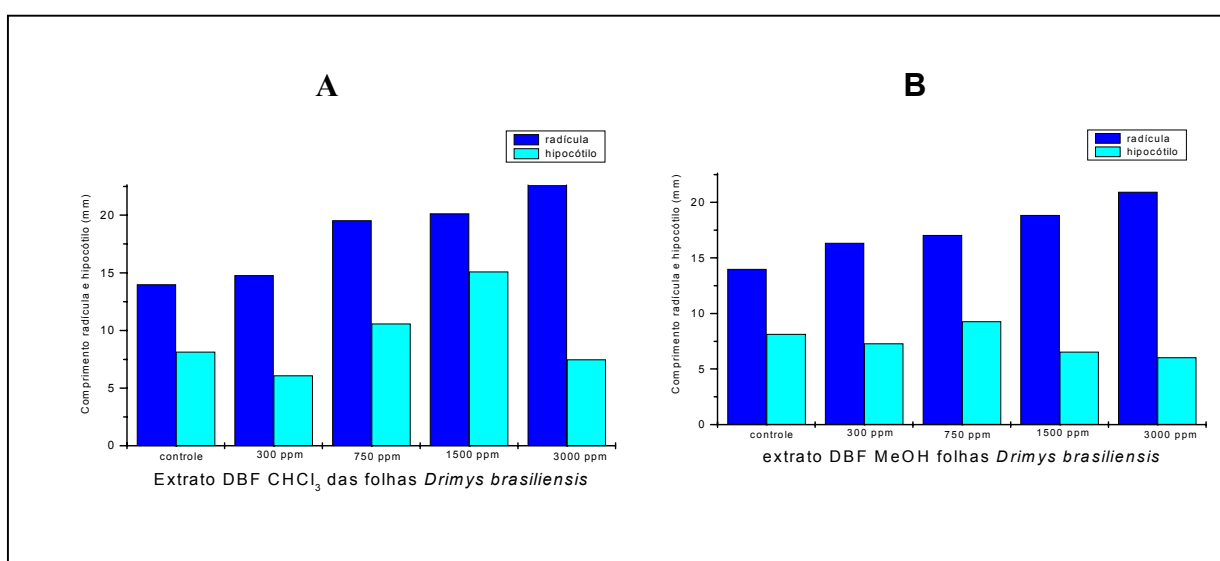


Figura 110 - Ação dos extratos DBF  $\text{CHCl}_3$  (A) e MeOH (B) das folhas de *Drimys brasiliensis* sobre o crescimento de *lactuca sativa*

Tabela 21 - Efeito dos extratos DBF  $\text{CHCl}_3$  e MeOH das folhas de *D.brasiliensis* sobre o crescimento da radícula e hipocótilo de *Lactuca sativa*

	Radícula			Hipocótilo		
	%		Desvio	%		Desvio
	crescimento		Padrão	crescimento		Padrão
Extrato DB $\text{CHCl}_3$						
300 ppm	+ 5,72	ns	2,07	- 25,15	*	1,16
750 ppm	+ 39,64 <sup>a</sup>	***	3,46	+ 30,06	**	2,46
1500 ppm	+ 43,93 <sup>a</sup>	***	2,50	+ 85,27	***	3,31
3000 ppm	+ 65,71	***	3,86	- 4,91	ns	1,71
Extrato DB MeOH						
300 ppm	+ 16,78 <sup>a</sup>	ns	3,18	- 10,43	ns	1,26
750 ppm	+ 21,78 <sup>a</sup>	**	2,04	+ 14,11	ns	1,72
1500 ppm	+ 34,74	***	2,81	- 19,63 <sup>a</sup>	*	1,60
3000 ppm	+ 49,62	***	2,72	- 25,76 <sup>a</sup>	***	1,23

Os valores são apresentados como percentagens em relação ao controle + estímulo, - inibição. Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna, para cada espécie receptora, não diferem entre si pelo teste de Tukey (ns  $P > 0,05$ ; \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ).

O poligodial (**8**) inibiu em 25% o crescimento da radícula na maior concentração ( $10^{-3}\text{M}$ ). Porém nas concentrações  $10^{-7}$  e  $10^{-9}\text{M}$  promoveu estímulo de 21% (Fig. 111 A, Tab 22). Para o hipocótilo observou-se diminuição de 20% em  $10^{-3}\text{M}$  e estímulo de 38% em  $10^{-9}\text{M}$ . Apesar da diminuição no comprimento da radícula e hipocótilo na concentração  $10^{-3}\text{M}$  não ser tão significativa, observou-se também uma mudança na morfologia das plântulas como, tortuosidade, mudança de coloração no apse (de branca para marrom) e ausência de pelos absorventes.

Para o drimanial (**48**) foi observada inibição no comprimento da radícula e do hipocótilo na concentração de  $10^{-3}\text{M}$  de 66 e 39% respectivamente. Para as concentrações  $10^{-7}$  e  $10^{-9}\text{M}$  foi observado um aumento no comprimento do hipocótilo (Fig. 111 B, Tab. 22). Também foram observadas modificações na morfologia das plântulas na concentração  $10^{-3}\text{M}$  como ocorrido no ensaio anterior.

A mistura de poligodial e drimanial 1:1 comportou-se praticamente igual ao drimanial, observando-se inibição no comprimento da radícula e do hipocótilo na concentração de  $10^{-3}$  de 39 e 41% respectivamente. Para as concentrações  $10^{-5}$ ,  $10^{-7}$  e  $10^{-9}$ M foi observado um aumento no comprimento do hipocótilo (Fig. 111 C, Tab. 22). Também foram observadas modificações na morfologia das plântulas na concentração  $10^{-3}$ M como ocorrido nos ensaios anteriores.

O composto 1- $\beta$ -(p-cumaroiloxi)-poligodial (**38**) apresentou perfil similar ao poligodial, para a maior concentração observa-se uma diminuição de 36 e 21% no comprimento da radícula e hipocótilo. Para as demais concentrações não foi observado nenhum efeito, como pode ser observado (Fig. 111 D, Tab 22).

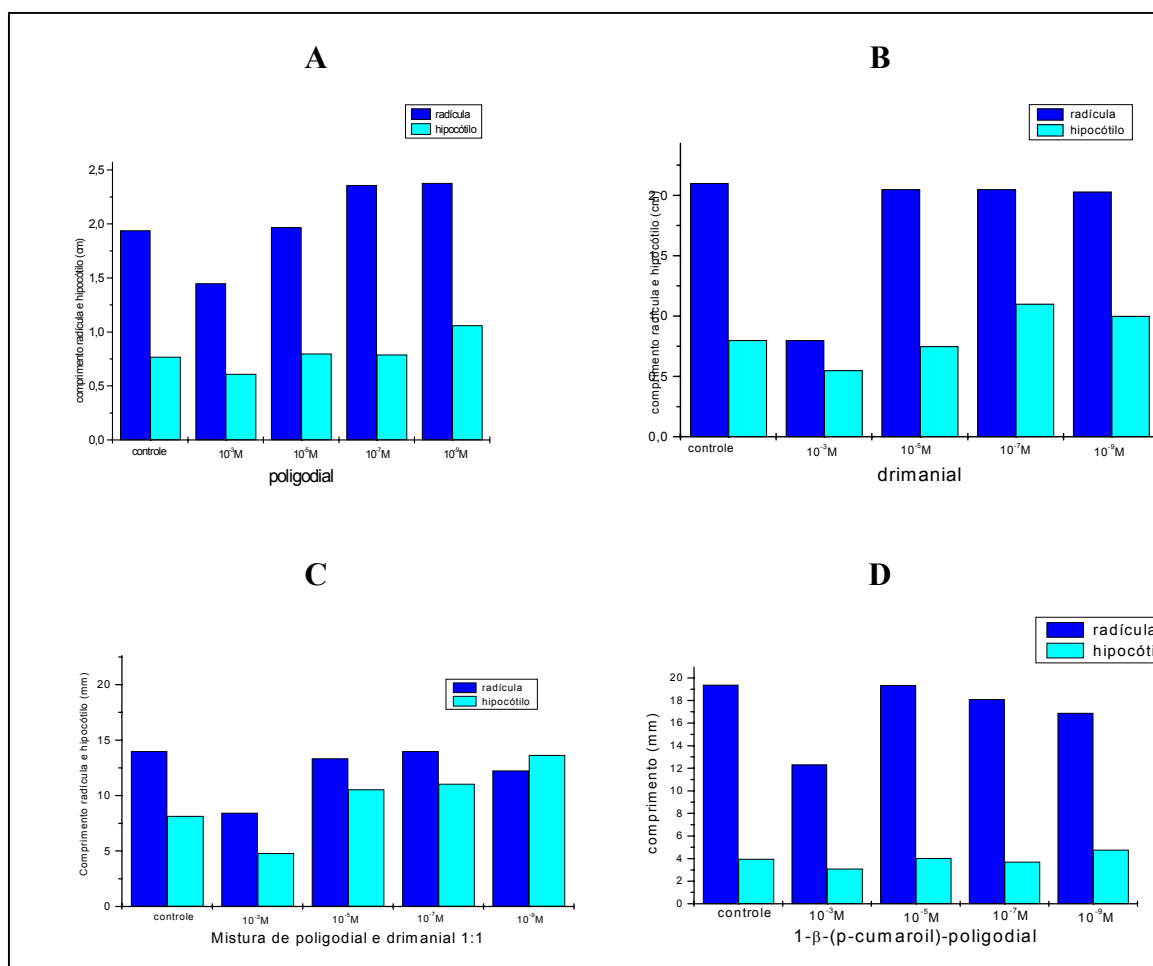


Figura 111 - Ação dos compostos poligodial (A), drimanial (B), mistura de poligodial e drimanial (C) e 1- $\beta$ -(p-cumaroil)-polygodial (D), isolados das cascas de *Drimys brasiliensis* sobre o crescimento de *lactuca sativa*

Tabela 22 - Efeito dos compostos poligodial, drimanial, mistura de poligodial e drimanial e 1- $\beta$ -(p-cumaroil)-polygodial, isolados das cascas de *Drimys brasiliensis* sobre o crescimento de *lactuca sativa*

	Radícula			Hipocótilo		
	% crescimento		Desvio Padrão	% crescimento		Desvio Padrão
Poligodial						
10 <sup>-3</sup> M	- 25,44	**	3,01	-20,13	*	1,26
10 <sup>-5</sup> M	+ 1,42	ns	2,95	+ 3,90 <sup>a</sup>	ns	2,27
10 <sup>-7</sup> M	+ 21,33 <sup>a</sup>	*	5,55	+ 3,29 <sup>a</sup>	ns	1,93
10 <sup>-9</sup> M	+ 22,36 <sup>a</sup>	**	4,17	+ 38,31	***	1,92
Drimanial						
10 <sup>-3</sup> M	- 66,06	***	2,60	- 39,61	***	1,30
10 <sup>-5</sup> M	+ 6,94 <sup>a</sup>	ns	3,88	+ 4,69	ns	1,27
10 <sup>-7</sup> M	+ 15,17 <sup>a</sup>	ns	3,18	+ 33,11 <sup>a</sup>	***	1,58
10 <sup>-9</sup> M	+ 4,88 <sup>a</sup>	ns	3,78	+ 37,01 <sup>a</sup>	***	1,93
Poligodial/Drimanial						
10 <sup>-3</sup> M	- 39,64	**	3,06	- 41,10	***	1,36
10 <sup>-5</sup> M	- 4,64 <sup>a</sup>	ns	2,39	+ 29,44 <sup>a</sup>	**	1,95
10 <sup>-7</sup> M	0,00 <sup>a</sup>	ns	1,77	+ 23,31 <sup>a</sup>	***	2,28
10 <sup>-9</sup> M	- 12,50 <sup>a</sup>	ns	2,05	+ 67,48	***	2,81
1- $\beta$ -(p-cumaroil)- poligodial						
10 <sup>-3</sup> M	- 36,45	***	4,42	- 21,72	*	1,30
10 <sup>-5</sup> M	+ 0,18 <sup>a</sup>	ns	3,45	+ 1,81 <sup>a</sup>	ns	1,27
10 <sup>-7</sup> M	- 6,63 <sup>a</sup>	ns	3,20	- 6,30 <sup>a</sup>	ns	1,58
10 <sup>-9</sup> M	- 12,89	ns	3,13	+ 20,07 <sup>a</sup>	ns	1,93

Os valores são apresentados como percentagens em relação ao controle + estímulo, - inibição. Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna, para cada espécie receptora, não diferem entre si pelo teste de Tukey (ns P>0,05; \* P<0,05; \*\* P<0,01; \*\*\* P<0,001).



Através dos experimentos pôde-se observar:

- Tanto os extratos quanto os compostos não influenciam no processo da germinação.
- De modo geral o extrato DB  $\text{CHCl}_3$  das cascas apresentou efeito inibidor de crescimento a partir da concentração de 750 ppm e estímulo na menor concentração. Este efeito é semelhante ao apresentado pelos reguladores de crescimento, que em baixas concentrações agem como hormônios de crescimento e em altas concentrações como herbicidas.
- Os extratos DBC  $\text{CHCl}_3$  e DBF  $\text{CHCl}_3$  (caules e folhas) promoveram estímulo da radícula a partir da concentração de 750 ppm, o inverso do que ocorreu para as cascas.
- Nos estudos químicos realizados com os extratos DB  $\text{CHCl}_3$ , DBC  $\text{CHCl}_3$  e DBF  $\text{CHCl}_3$  (cascas, caules e folhas) constatou-se uma diferença na composição química. Nas cascas, onde ocorreu a inibição são encontrados os sesquiterpenos drimanos, os quais devem ser os responsáveis pela atividade apresentada, como visto quando testados o poligodial (8) e o drimanial (47) e 1- $\beta$ -(p-cumaroil)-poligodial.
- Todos os 3 extratos metanólicos, comportaram-se da mesma maneira, promovendo estímulo a partir da concentração de 750 ppm. Estes extratos não foram estudados quimicamente, porém estudos preliminares apresentaram compostos fenólicos. É de interesse o estudo destes extratos, pois estes compostos parecem atuar como hormônios de crescimento.
- A inibição no crescimento de plântulas, sob ação alelopática, do ponto de vista ecológico, é um mecanismo mais eficiente de seleção do que a inibição da germinação. Isto porque a descendência seria eliminada por morte dos indivíduos.
- O mecanismo de ação dos aleloquímicos encontrados nas cascas é um desafio ainda a ser investigado.

#### 5.6.1.2. Semente alvo *Clusia parviflora*

Visto que o extrato DB  $\text{CHCl}_3$  das cascas de *D. brasiliensis* e os drimanos poligodial, drimanal e 1- $\beta$ -(p-cumaroil)-poligodial apresentaram efeito inibitório no crescimento de *Lactuca sativa*, a qual foi obtida comercialmente, portanto previamente tratada e com perfil de germinação de 85%. Realizou-se um novo experimento utilizando uma semente silvestre na tentativa de se ter condições mais naturais. Escolheu-se a *Clusia* por ter um perfil de germinação curto.

#### Ensaio de Germinação

Neste ensaio foram testados os extratos  $\text{CHCl}_3$  e MeOH das cascas de *D. brasiliensis* nas concentrações de 3000, 1500, 750 e 300 ppm e os compostos DW-1 poligodial (**8**) e DW-2 drimanal (**47**) nas concentrações de  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-7}$  e  $10^{-9}$ M. Utilizou-se como semente alvo *Clusia parviflora*. Não se observaram diferenças no perfil de germinação dos extratos e compostos com relação ao controle nas concentrações analisadas.

#### Ensaio de crescimento

No extrato BD  $\text{CHCl}_3$  das cascas (Fig. 112 A, Tab. 23) é observado a partir de 750 ppm uma nítida diminuição no comprimento tanto da radícula como do hipocótilo, chegando a 56 e 65% respectivamente na concentração de 3000 ppm. Além da variação no comprimento da radícula e hipocótilo, observou-se também uma mudança na morfologia das plântulas como, tortuosidade, mudança de coloração no apse (de branca para marrom) e ausência de pelos absorventes.

No extrato DB MeOH das cascas (Fig. 112 B, Tab. 23) é observado aumento no comprimento da radícula de 22% na concentração de 750 ppm, porém ocorre uma diminuição no comprimento do hipocótilo a partir desta concentração.

O poligodial e o drimanial inibiram o crescimento da radícula (25 e 27%) e do hipocótilo (72 e 69%) na maior concentração (Fig. 112 C e D, Tab. 23). Para as outras concentrações não se observou efeito para os dois compostos.

Além da diminuição no comprimento da radícula na concentração  $10^{-3}$ M, observou-se também uma mudança na morfologia das plântulas como, tortuosidade, mudança de coloração no apse (de branca para marrom) e ausência de pelos absorventes.

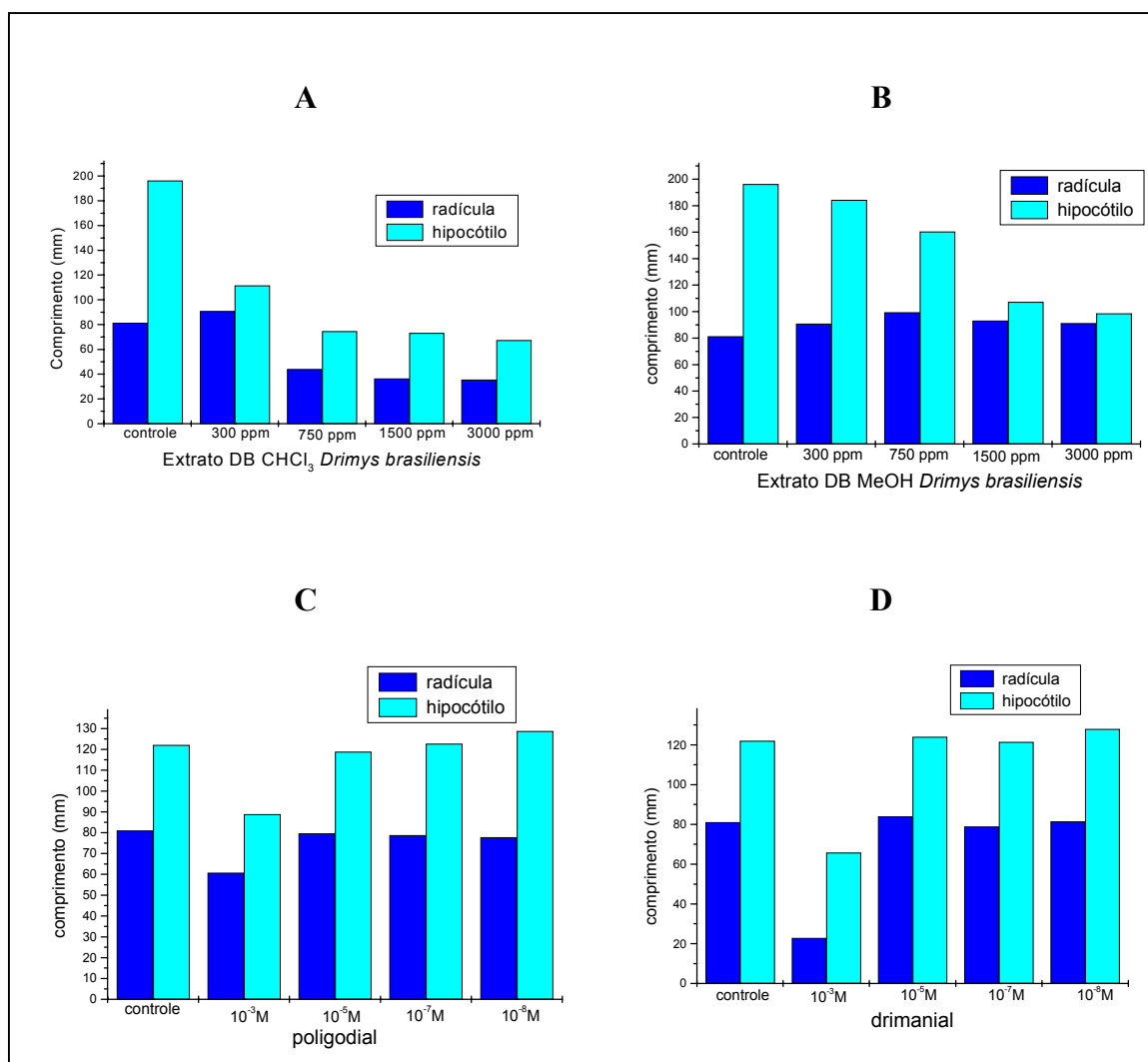


Figura 112 - Ação dos extratos BD  $\text{CHCl}_3$  (A) e MeOH (B) e dos compostos poligodial (C), drimanial (D) sobre o crescimento de *Clusia parviflora*

Tabela 23 - Efeito dos extratos DB CHCl<sub>3</sub> e MeOH e dos compostos poligodial e drimaniol sobre o crescimento da radícula e hipocótilo de *Clusia parviflora*

	Radícula			Hipocótilo		
	% crescimento		Desvio Padrão	% crescimento		Desvio Padrão
Extrato DB CHCl <sub>3</sub>						
300 ppm	+ 11,75	ns	1,44	- 43,24	***	1,72
750 ppm	- 45,81 <sup>a</sup>	***	2,07	- 62,71 <sup>a</sup>	***	1,600
1500 ppm	- 55,23 <sup>a</sup>	***	1,70	- 62,72 <sup>a</sup>	***	1,13
3000 ppm	- 56,28 <sup>a</sup>	***	1,80	- 65,73 <sup>a</sup>	***	1,00
Extrato DB MeOH						
300 ppm	+ 11,54 <sup>a</sup>	ns	2,16	- 6,13 <sup>a</sup>	ns	3,72
750 ppm	+ 22,29 <sup>a</sup>	**	1,78	- 18,33 <sup>a</sup>	**	2,97
1500 ppm	+ 14,42 <sup>a</sup>	ns	1,55	- 45,36 <sup>b</sup>	***	2,27
3000 ppm	+ 12,20 <sup>a</sup>	ns	2,10	- 49,78 <sup>b</sup>	***	1,49
Poligodial						
10 <sup>-3</sup> M	- 25,11	**	2,10	-27,19	***	1,73
10 <sup>-5</sup> M	+ 1,76 <sup>a</sup>	ns	1,71	- 2,62 <sup>a</sup>	ns	1,99
10 <sup>-7</sup> M	- 2,73 <sup>a</sup>	ns	1,55	+ 0,45 <sup>a</sup>	ns	2,07
10 <sup>-9</sup> M	- 4,05 <sup>a</sup>	ns	2,19	+ 5,48 <sup>a</sup>	ns	2,64
Drimaniol						
10 <sup>-3</sup> M	- 71,72	***	0,91	- 69,45	***	0,90
10 <sup>-5</sup> M	+ 3,61 <sup>a</sup>	ns	1,58	+ 2,28 <sup>a</sup>	ns	1,58
10 <sup>-7</sup> M	- 2,64 <sup>a</sup>	ns	1,75	- 0,90 <sup>a</sup>	ns	1,75
10 <sup>-9</sup> M	+ 0,58 <sup>a</sup>	ns	1,56	+ 7,32 <sup>a</sup>	ns	1,56

Os valores são apresentados como percentagens em relação ao controle + estímulo, - inibição. Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna, para cada espécie receptora, não diferem entre si pelo teste de Tukey (ns P>0,05; \* P<0,05; \*\* P<0,01; \*\*\* P<0,001).

Comparando os testes realizados com as sementes alvo *Lactuca sativa* e *Clusia parviflora*, verificou-se o mesmo perfil de comportamento tanto para os extratos como para os compostos analisados.

#### 5.6.2. ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

A atividade antifúngica dos extratos  $\text{CHCl}_3$  e MeOH das cascas, caules e folhas e de compostos isolados das cascas de *D. brasiliensis* estão apresentados nas Tab. 24 e 25.

O extrato DB  $\text{CHCl}_3$  (cascas) apresentou significativa atividade para os fungos *M. canis*, *M. gypseum*, *E. floccosum*, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, , *C. tropicalis* e *C. neoformans*. O extrato DBC  $\text{CHCl}_3$  (caules) também apresentou atividade para os seguintes fungos *M. canis*, *M. gypseum*, *E. floccosum*, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, e *C. neoformans*, porém a atividade apresentada pelos caules não foi tão pronunciada quanto para as cascas. Todos os outros extratos apresentaram-se inativos frente aos fungos analisados.

Determinou-se também a atividade antifúngica dos compostos poligodial (**8**), drimanial (**47**), 1- $\beta$ -(p-metoxicinamil) poligodial (**10**) e de DW-4 e DW-6, que não foram identificados. O poligodial apresentou grande atividade contra os fungos *E. floccosum* e *T. rubrum*, com CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) de 3 e 25, respectivamente. O composto DW-6 (impuro) apresentou atividade para todos os fungos testados, com destaque para os fungos *M. canis* e *T. rubrum*, com CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) de 12,5 e 6,25, respectivamente. O composto DW-8 mostrou-se ativo contra *M. canis*, *M. gypseum*, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* e principalmente contra *E. floccosum*, com CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) de 6,25. Os compostos drimanial e DW-4 não foram ativos até a concentração máxima utilizada (100  $\mu\text{g/mL}$ ).

Os resultados obtidos, sugerem que os drimanos são os responsáveis pela atividade antifúngica apresentada pelas cascas de *D. brasiliensis*. Além disso foi possível verificar que pode estar ocorrendo um efeito sinérgico entre os compostos, uma vez que a atividade apresentada pelas cascas contra o fungo *E. floccosum* é maior do que os compostos puros isolados.

A atividade antifúngica do poligodial (**8**) contra os fungos *Sacharomyces cerevisiae* e *Candida utilis* já é bem conhecida. Sabe-se também que a atividade do

antifúngico anfotericina B é aumentada quando combinado com poligodial.<sup>74,76-79,81</sup> Os compostos drimaniol (**47**) e 1-β-(p-metoxicinamil)-poligodial (**10**) ainda não haviam sido testados quanto a atividade antifúngica. Também não foi encontrado nenhum estudo para a atividade de drimanos contra os fungos *M. canis*, *M. gypseum* e *E. floccosum*.

Tabela 24 – Atividade antifúngica apresentada pelos extratos das cascas, caules e folhas de *D. brasiliensis* (CIM µg/mL)

	<i>M.</i> <i>canis</i>	<i>M.</i> <i>gypseum</i>	<i>E.</i> <i>floccosum</i>	<i>T.</i> <i>rubrum</i>	<i>T.</i> <i>mentagrophytes</i>
DB CHCl <sub>3</sub>	<b>100</b>	<b>62,5</b>	<b>12,5</b>	<b>62,5</b>	<b>100</b>
Cascas					
DB MeOH	500	1000	500	1000	1000
Cascas					
DBC CHCl <sub>3</sub>	<b>250</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>250</b>
Caules					
DBC MeOH	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
Caules					
DBF CHCl <sub>3</sub>	500	1000	500	500	1000
Folhas					
DBF MeOH	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
Folhas					

	<i>C.</i> <i>tropicalis</i>	<i>C.</i> <i>neoformans</i>	<i>A.</i> <i>fumigatus</i>	<i>A.</i> <i>flavus</i>	<i>A.</i> <i>niger</i>
DB CHCl <sub>3</sub>	<b>250</b>	<b>125</b>	>1000	>1000	>1000
Cascas					
DB MeOH	1000	<b>250</b>	>1000	>1000	>1000
Cascas					
DBC CHCl <sub>3</sub>	1000	500	>1000	>1000	>1000
Caules					
DBC MeOH	1000	>1000	>1000	>1000	>1000
Caules					
DBF CHCl <sub>3</sub>	1000	>1000	>1000	>1000	>1000
Folhas					
DBF MeOH	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
Folhas					

Tabela 25 – Atividade antifúngica apresentada pelos compostos isolados das cascas de *D. angustifolia* e *D. brasiliensis* (CIM  $\mu\text{g/mL}$ )

	<i>M.</i> <i>canis</i>	<i>M.</i> <i>gypseum</i>	<i>E.</i> <i>floccosum</i>	<i>T.</i> <i>rubrum</i>	<i>T.</i> <i>mentagrophytes</i>
Poligodial ( <b>8</b> )	>100	>100	<b>3</b>	<b>25</b>	>100
Drimanial ( <b>47</b> )	>100	>100	>100	>100	>100
DW-4	>100	>100	>100	>100	>100
DW-6 (impuro)	<b>12,5</b>	<b>100</b>	<b>50</b>	<b>6,25</b>	<b>25</b>
1- $\beta$ -(p-metoxicinamil) poligodial ( <b>10</b> )	<b>100</b>	<b>50</b>	<b>6,25</b>	<b>25</b>	<b>62,5</b>

	<i>C.</i> <i>tropicalis</i>	<i>C.</i> <i>neoformans</i>	<i>A.</i> <i>fumigatus</i>	<i>A.</i> <i>flavus</i>	<i>A.</i> <i>niger</i>
Poligodial ( <b>8</b> )	>100	>100	>100	>100	>100
Drimanial ( <b>47</b> )	>100	>100	>100	>100	>100
DW-4	>100	>100	>100	>100	>100
DW-6 (impuro)	<b>100</b>	<b>25</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
1- $\beta$ -(p-metoxicinamil) poligodial ( <b>10</b> )	250	250	>250	>250	>250

### 5.6.3. ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA OU ANALGÉSICA

A atividade antinociceptiva do poligodial (**8**), drimanial (**47**) e 1- $\beta$ -(p-metoxicinamil)-poligodial (**10**) foi analisada pelo modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos. O drimanial também foi testado no modelo de dor induzida pela formalina.

O drimanial produz inibição quase completa das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, sendo dose-dependente. A  $\text{DI}_{50}$  (Dose Inibitória 50%) exibida pelo drimanial corresponde praticamente a potência daquela apresentada pelo 1- $\beta$ -(p-metoxicinamil)-poligodial, mas aproximadamente 3 vezes menos potente que poligodial. O poligodial foi 37 vezes mais potente do que os fármacos

conhecidos como a aspirina e acetaminofeno, enquanto o drimanial foi 12 vezes e o 1- $\beta$ -(*p*-metoxicinamil)-poligodial 8 vezes mais potente (Tab. 26).

Tabela 26 – Atividade antinociceptiva de poligodial (**8**), drimanial (**47**) e 1- $\beta$ -(*p*-metoxicinamil)-poligodial (**10**) analisadas pelo modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos

Composto	DI <sub>50</sub> ( $\mu$ mol/kg, i.p.) <sup>a</sup>	IM (%) <sup>b</sup>
Poligodial ( <b>8</b> ) <sup>c</sup>	3.6 (2.6 - 5.0)	90 $\pm$ 3
Drimanial ( <b>48</b> )	11.0 (10.3 - 11.5)	92 $\pm$ 3
1- $\beta$ -( <i>p</i> -methoxycinamil) polygodial ( <b>10</b> ) <sup>c</sup>	16.0 (12.0 - 21.0)	93 $\pm$ 3
Aspirina <sup>d</sup>	133.1 (73.0 – 243.3)	83 $\pm$ 2
Acetaminofeno <sup>d</sup>	125.0 (104.0 – 250.0)	88 $\pm$ 1

<sup>a</sup> Com seu respectivo limite de confiança de 95%

<sup>b</sup> Inibição Máxima

<sup>c</sup> Dados de Cechinel Filho et al., 1998<sup>45</sup>

<sup>d</sup> Dados de Vaz et al., 1996.<sup>106</sup>

Pelos resultados obtidos na Tab. 26 observa-se que a introdução do grupamento cinamil no carbono C-1 de drimanial e 1- $\beta$ -(*p*-metoxicinamil)-poligodial diminui a atividade em relação ao poligodial. Quando a atividade é comparada entre drimanial e 1- $\beta$ -(*p*-metoxicinamil)-poligodial, verifica-se que a introdução do grupamento OH no carbono C-5 de drimanial, a atividade é ligeiramente aumentada.

O drimanial inibiu ambas as fases da dor, quando analisado no teste da formalina, o efeito antinociceptivo foi mais pronunciado na segunda fase, sendo 8 vezes mais potente do que a aspirina e paracetamol na segunda fase do teste. Na Tabela 27 está apresentado o resultado do teste da formalina com o drimanial. Na Fig. 113 observa-se que o drimanial causa efeito analgésico significativo quando avaliado na dor neurogênica (primeira fase) e inflamatória (segunda fase)



Tabela 27 – Comparação do efeito antinociceptivo de drimanial (47) com medicamentos antiinflamatórios não esteroidais e analgésicos

Composto	Teste da Formalina			
	1ª fase <sup>1</sup>	IM	2ª fase <sup>2</sup>	IM
	ID <sub>50</sub> (μmol/kg, ip)	(%)	ID <sub>50</sub> (μmol/kg, ip)	(%)
Drimanial (48)	19.5 (10.5-35.9)	67 ± 2.2	16.0 (9.6-26.3)	98 ± 1.2
Aspirina	Inativo	-	133 (77-209)	88 ± 3.0
Paracetamol	Inativo	-	125 (90-161)	85 ± 5.0

Cada grupo representa a média ± s.e.m. de seis experimentos. <sup>1</sup> 0-5 lambida (s) min ; <sup>2</sup> 15-30 lambida(s) min; IM = inibição máxima.

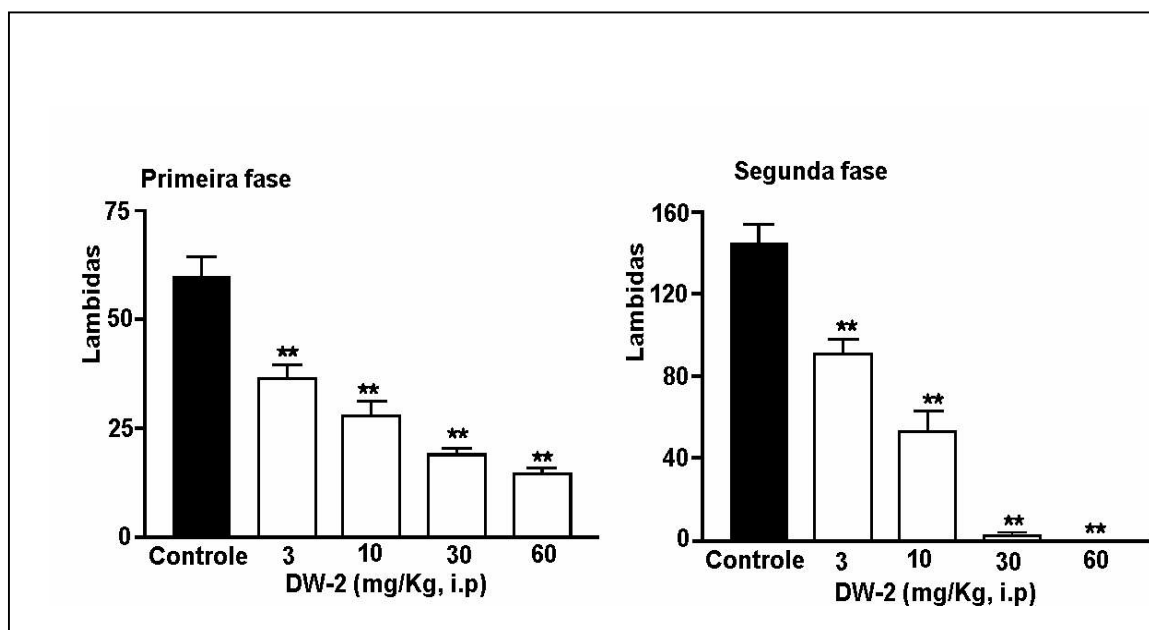


Figura 113 – Efeito do drimanial sobre a dor induzida pela formalina administrado por via i.p.

Para determinar se a atividade antinociceptiva de drimanial na dor induzida pela formalina está relacionada com a ação anti-oedematogênica, foi medido o edema da pata por comparação da diferença no peso da pata tratada com a formalina e o peso da pata controle. Os resultados mostram que a ação antinociceptiva de drimanial sob a segunda fase do teste da formalina, não estão associados com a formação do

edema. Estudos estão sendo realizados para elucidar o mecanismo de ação antinociceptiva de drimanial.

Considerando o potencial analgésico do poligodial e drimanial, e a quantidade isolada destes compostos, realizaram-se modificações estruturais na molécula de poligodial, na tentativa de se fazer alguma correlação entre estrutura e atividade. Porém de todas modificações realizadas, somente a redução dos grupos aldeídicos do poligodial forneceu um composto com grau de pureza adequado para os testes farmacológicos. Desta forma o drimendiol (**11**) foi testado no modelo da formalina em camundongos. Também foram testados neste experimento o isopoligodial (**9**), isolado das cascas de *D. angustifolia* e o drimenol (**12**) cedido pelo Prof. J. F. Ciccio da Universidade da Costa Rica, este composto foi identificado neste trabalho no extrato CHCl<sub>3</sub> da *D. basiliensis* por CG/MS.

Na Fig. 114 pode ser observado que dos 3 compostos analisados, somente o drimendiol (**12**) apresentou efeito antinociceptivo, com cerca de 50% de inibição na segunda fase.

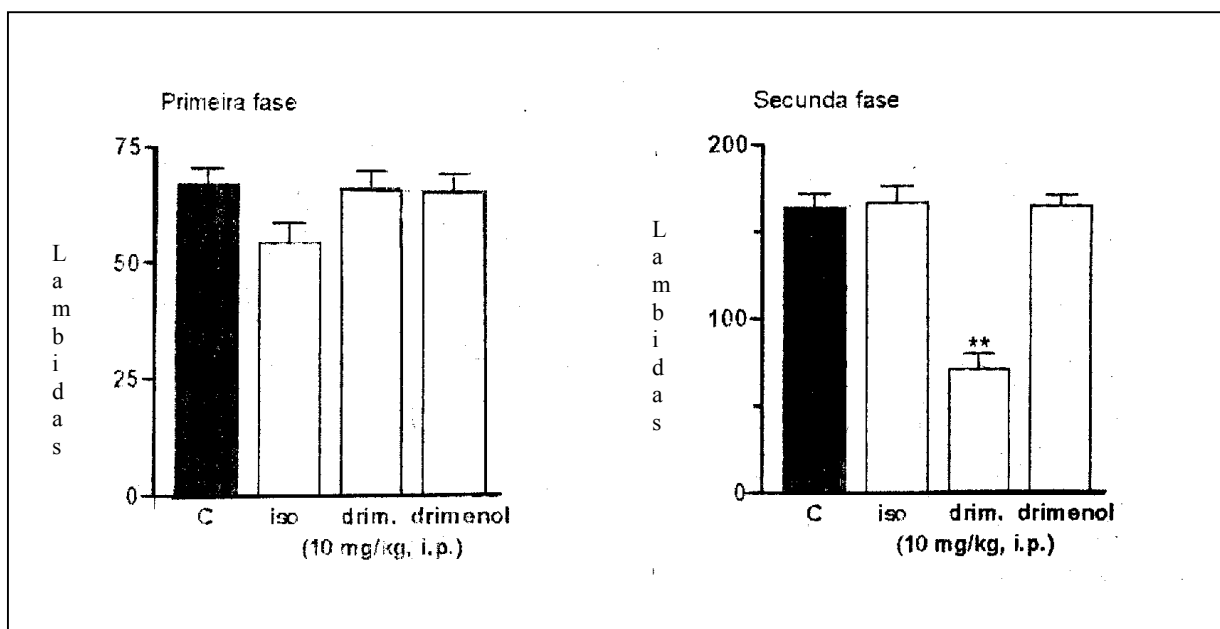


Figura 114 – Efeito do isopoligodial, drimendiol e drimenol sobre a dor induzida pela formalina administrado por via i.p (10 mg/Kg).

O isopoligodial é um epímero do poligodial, os dois compostos diferem entre si na estereoquímica do grupo aldeído ligado ao carbono C-9. O poligodial quando testado neste modelo apresentou-se muito ativo em ambas as fases da dor.<sup>90</sup>

Sabe-se que a estereoquímica e a presença de substituintes pode modular a reatividade e a bioatividade de aldeídos insaturados consideravelmente. Por exemplo, o poligodial reage com aminas primárias sob condições biomiméticas para formar pirrois. Esta reação tem sido proposta como sendo a responsável pela bioatividade do poligodial. O isopoligodial, não sofre a mesma reação porque a formação do pirrol é menos favorecida devido a maior distância entre os grupos aldeídos.<sup>109</sup>

Para a atividade antinociceptiva testada, verificou-se a importância do grupamento aldeídico em C-9, visto que o drimendiol e drimenol que não apresentam este grupamento, não apresentaram atividade, além do que este grupamento deve estar em  $\beta$ .

Os resultados obtidos no presente trabalho em conjunto com os resultados anteriores obtidos pelo nosso Grupo, indicam que os sesquiterpenos drimanos são os responsáveis pelos efeitos analgésicos, anti-inflamatórios e anti-alérgicos apresentados pelo extrato das cascas de *D. angustifolia*.<sup>86-88,103</sup>

## 6. CONCLUSÕES

Os estudos químicos e biológicos realizados com as espécies *Drimys angustifolia* e *Drimys brasiliensis* permitiram as seguintes conclusões:

### Estudos Químicos:

- a) Da fração  $\text{CHCl}_3$  obtida a partir do extrato EtOH das cascas de *D. angustifolia* foram obtidos dois novos sesquiterpenos drimanos, denominados como drimanal e 1- $\beta$ -(p-metoxicinamil)-isopoligodial. Foram isolados também poligodial, isopoligodial, mukaadial, 1- $\beta$ -(p-metoxicinamil)-poligodial, 1- $\beta$ -(p-cumaroil)-poligodial, bem como uma mistura de dois compostos derivados de drimanos os quais parecem ser inéditos. Dos compostos conhecidos isolados 1- $\beta$ -(p-cumaroil)-poligodial não foi citado na espécie estudada e o mukaadial está sendo relatado pela primeira vez no gênero *Drimys*.
- b) Da espécie *D. brasiliensis* isolou-se, do extrato  $\text{CHCl}_3$  das cascas, os sesquiterpenos drimanos poligodial, drimanal, 1- $\beta$ -(p-metoxicinamil)-poligodial e epifuegina. Somente o poligodial havia sido relatado para esta espécie, sendo que o drimanal foi isolado pela primeira vez durante este trabalho da espécie *D. angustifolia* e a epifuegina ainda não havia sido relatada na literatura. Através de dados de CG/EM, verificou-se a presença de drimenol neste extrato.
- c) Do extrato  $\text{CHCl}_3$  dos caules de *D. brasiliensis* foram isolados uma mistura de ácidos e álcoois graxos.
- d) Do extrato  $\text{CHCl}_3$  das folhas de *D. brasiliensis* foram isolados uma mistura de ácidos e álcoois graxos, bem como mistura de  $\alpha$  e  $\beta$  cubebina. Estas lignanas ainda não haviam sido relatadas para esta espécie.

e) Devido a atividade biológica apresentada pelo poligodial, foram realizadas modificações estruturais visando otimizar o efeito analgésico verificado. Obteve-se sucesso na redução dos grupos aldeídicos, na formação de dioxima, no derivado 2,4-dinitrofenilidrazona e no derivado p-aminoacetofenona. Na reação com bromo formou um produto inesperado, ainda não identificado. Verificou-se também que o poligodial solubilizado em etanol e sob refluxo converte-se no seu epímero o isopoligodial.

f) Verificou-se o perfil cromatográfico, por cromatografia gasosa, dos extratos  $\text{CHCl}_3$  das cascas, caules e folhas da *D. brasiliensis*. Utilizou-se este método devido os extratos serem constituídos de compostos de baixa polaridade e por ser útil para a padronização de extratos vegetais. Observou-se que o poligodial é o composto majoritário nestes extratos. O alto rendimento deste composto é um fator positivo, uma vez que ele vem sendo considerado uma molécula alvo na obtenção de novos fármacos analgésicos e anti-inflamatórios. Pela análise dos espectros de massas obtidos observou-se a presença de drimanos somente nas cascas.

### **Estudos biológicos:**

#### **a) Atividade Alelopática**

Verificou-se que o extrato de  $\text{CHCl}_3$  das cascas e os compostos poligodial, drimanal e 1- $\beta$ -(p-cumaroil)-poligodial apresentaram efeito inibitório do crescimento de *Lactuca sativa* e *Clusia parviflora*. Os extratos DBC  $\text{CHCl}_3$  e DBF  $\text{CHCl}_3$  (caules e folhas) e os 3 extratos metanólicos (cascas, caules e folhas), comportaram-se de maneira semelhante, promovendo estímulo a partir da concentração de 750 ppm quando testados em *Lactuca sativa*.

#### **b) Atividade Antifúngica**

O extrato DB  $\text{CHCl}_3$  (cascas) apresentou significativa atividade para os fungos *M. canis*, *M. gypseum*, *E. floccosum*, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *C. tropicalis* e *C. neoformans*. O extrato DBC  $\text{CHCl}_3$  (caules) também apresentou atividade para

alguns fungos porém a atividade apresentada pelos caules não foi tão pronunciada quanto para as cascas. O poligodial apresentou potente atividade contra os fungos *E. floccosum* e *T. rubrum*. O 1- $\beta$ -(p-metoxicinamil)-poligodial mostrou-se ativo contra *M. canis*, *M. gypseum*, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* e principalmente contra *E. floccosum*.

c) Atividade antinociceptiva

O poligodial, drimanial e o 1- $\beta$ -(p-metoxicinamil)-poligodial apresentaram atividade antinociceptiva quando testados no modelo de dor de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos, sendo 37, 12 e 8 vezes, respectivamente, mais ativos do que a aspirina no modelo analisado. O drimanial também foi testado no modelo de dor induzida pela formalina, sendo 8 vezes mais ativo do que a aspirina. O isopoligodial quando testado no modelo da formalina apresentou-se inativo, e o poligodial neste modelo foi muito ativo. Os dois compostos são epímeros e diferem na estereoquímica do grupo aldeídico ligado ao carbono C-9, sugerindo a necessidade do grupo aldeídico em  $\beta$ . Os drimanos drimenol e drimendiol também foram testados neste modelo e mostraram-se inativos. Estes dois compostos não possuem grupamentos aldeídicos.

Os resultados obtidos neste trabalho são importantes sob o ponto de vista químico e medicinal, visto que drimanos são os responsáveis pela atividade apresentada pela casca, confirmando o uso popular destas plantas no tratamento de diversas patologias.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- VLIETINCK, A. J. The future of Phytochemistry in the new millennium. In: **2000 Years of Natural Products Research Past, Present and Future**, Ed. Teus J. C. Luijendijk, Phytoconsult, 2000.
- 2- CORDELL, G. Changing strategies in natural products chemistry. **Phytochemistry**, v. 40, n. 6, p. 1585-1612, 1995.
- 3- BRAZ FILHO, R. Química de produtos naturais: importância, interdisciplinaridade, dificuldades e perspectivas. A peregrinação de um pacatubano. **Quím. Nova**, v. 17, n. 5, p. 405-20, 1994.
- 4- PETTIT, G. R. Progress in the discovery of biosynthetic anticancer drugs. **J. Nat. Prod.** n. 59, p. 812-821, 1996.
- 5- VERPOORTE, R. Secondary Metabolism. In: **Metabolic Engineering of Plant Secondary metabolism**, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 2000.
- 6- HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. 7. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v. 30, n. 2, p. 3864-74, 1991.
- 7- DEMAINE, A. L. Indiolites from microorganisms: a brilliant past, a bright future. In: **2000 Years of Natural Products Research Past, Present and Future**, Ed. Teus J. C. Luijendijk, Phytoconsult, 2000.
- 8- SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Ed. Universidade/UFRGS / Ed. da UFSC, Porto Alegre / Florianópolis, 1999.
- 9- DI STASI, L. CL Química de produtos naturais: Principias constituintes ativos. In: **Plantas Medicinais: Arte e Ciência Um guia de estudo interdisciplinar**, Ed. Unesp, São Paulo, 1996.
- 10-SHU, Y. Z. Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. **J. Nat. Prod.** v. 61, p. 1053-1071, 1998.
- 11- MILES, D. H.; NGUYEN, C. L.; MILES, D. H. Utilization of Natural Products for treatment of blood diseases. . **Curr. Med. Chem.** n. 5, p. 421-440, 1998.
- 12- CALIXTO, J. B.; BEIRITH, A.; FERREIRA, J.; SANTOS, A. R. S.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Natural occurring Antinociceptive substances from plants. **Phytoterapy Research**, n. 14, p. 401-418, 2000.
- 13- KASHIWADA, y.; WANG, H. K.; NAGAO, T.; KITANAKA, S.; et. al. Anti-AIDS Agents. 30. Anti-HIV activity of oleanolic acid, pomolic acid, and structurally related triterpenoids. **Jor. Nat. Prod.**, v. 61, p. 1090-1095, 1998.

- 14- STERNER, O. & SZALLASI, A. Novel natural vanilloid receptor agonists: new therapeutic targets for drug development. **Trends Pharmacol. Sciences**, v. 20, n. 11, p. 459-65, 1999.
- 15- HARVEY, A. L., WATERMAN, P.G. The continuing contribution of biodiversity to drug discovery. **Current Opinion in Drug Discovery and Development**, v. 1, n. 1, p. 71-76, 1998.
- 16- TYLER, V. E. Phytomedicine: Back to the Future. **J. Nat. Prod.** v. 62, p. 1589-92, 1999.
- 17- SCHRODER, H. C.; MERZ, H.; STEFFEN, R.; MÜLLER, E. G.; SARIN, P. S.; TRUMM, S.; SCHULZ, J.; EICH, E. Differential *in vitro* anti-HIV activity of natural lignans. **Z. Naturforsch.**, n. 45c, p. 1215-1221, 1990.
- 18- LOZAYA, X. Fármacos de origem vegetal de ayer y de hoy. **Investigacion y Ciencia**, p. 4-10, nov. 1997.
- 19- SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETRIVICK, P. R. Produtos naturais de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Ed. Universidade/UFRGS / Ed. da UFSC, Porto Alegre / Florianópolis, 1999.
- 20- VROMAN, J. A.; ALVIN-GASTON, M.; AVERY, M.A. Current progress in the chemistry, medicinal chemistry and drug design of artemisin based antimalarials. **Curr. Pharm. Des.** n. 5, p. 101-138, 1999.
- 21- HARBORNE, J. B. **Introduction to ecological biochemistry**. 3 ed. London: Academic Press, 1988.
- 22- VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B. Plantas inseticidas. In: **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Ed. Universidade/UFRGS / Ed. da UFSC, Porto Alegre / Florianópolis, 1999.
- 23- EINHELLIG, F. A. Allelopathy: Current Status and Future Goals. In: INDERJIT; DAKSHINI, K. M. M. & EINHELLING, F. A. **Allelopathy organisms, processes, and applications**. ACS Symposium series 582, 1995.
- 24- MACIAS, F. A.; GALINDO, J. C. G.; MOLINILLO, J. M. G.; Plant Biocommunicators: Application of Allelopathic Studies. In: **2000 Years of Natural Products Research Past, Present and Future**, Ed. Teus J. C. Luijendijk, Phytoconsult, 2000.
- 25- RICE, E. L. Allelopathy: An overview. In: Waller, G. R. **Allelochemicals: Role in agriculture and forestry**. S Symposium series n. 330, 8-22, 1987.
- 26- EINHELLIG, F. A. Mechanism of action of allelochemicals in allelopathy. In: Inderjit et al (ed) **Allelopathy Organisms, Processes, and applications**. ACS Symp. Serie 582. Am Chem. Soc. Washington DC, 1995



- 27- SIEGLER, D. S. Chemistry and mechanisms of allelopathic interactions. **Agron. J.**, v. 36, p. 876-885, 1996.
- 28- RICE, E. L. **Allelopathy**. Academic Press Inc. (London) Ltd. 1984
- 29- WALLER, G. R. **Allelochemicals: role in agriculture and forestry**. ACS Symposium series n. 330, 1987.
- 30- SHARMA, I. S. Road to sustainable agriculture. Capturado em 16 agosto 99. Online disponível na internet <http://www.tribuneindia.com/99jan16/agro.htm>
- 31- CARROL, M. W., Allelopathic interactions in a temperate forest setting by higher woody plants and understory components. Capturado em 11/08/99. Online. Disponível internet <http://www.colostate.edu/Depts/Entomology/courses/en570/papers-1994/carroll.html>
- 32- ALMEIDA, F. S. de. **A alelopatia e as plantas**. Londrina, Fundação Instituto Agrônômico do Paraná, 1988
- 33- CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Quím. Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.
- 34- MING, L.C. Coleta de plantas medicinais. In: **Plantas Medicinais: Arte e Ciência Um guia de estudo interdisciplinar**, Ed. Unesp, São Paulo, 1996.
- 35- MATOS, F. J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. Fortaleza: UEFC, 1988.
- 36- GHISALBERTI, E. L. Detection and isolation of bioactive natural products. In: **Bioactive Natural compounds**, Ed. Colegate, S.M., Molyneux, R.J. CRC Press, USA, 1993.
- 37- FERRI, P. H. Química de produtos naturais: Métodos gerais. In: **Plantas Medicinais: Arte e Ciência Um guia de estudo interdisciplinar**, Ed. Unesp, São Paulo, 1996.
- 38- BUCKINGHAM, J.; THOMPSON, S. The Dictionary of natural products and other informations sources for natural products scientists. In: Ed. VRIGLEY, S.; HAYS, M.; THOMAS, R.; CHRYSTAL, E. **Phytochemical diversity a source of new industrial products**, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1997.
- 39- MONTANARI, C. A. Química medicinal: Contribuição e perspectiva no desenvolvimento da farmacoterapia. **Quím. Nova**, v. 18, n. 1, p. 56-64, 1995.
- 40- BARROSO, M. G. **Sistemática de angiospermas do Brasil**, v. 2, Viçosa:UFV/Imprensa Univ. , 1991.

- 41- WILLIAMS, C. A.; HARVEY, W.J. Leaf. Leaf flavonoid patterns in the Winteraceae. **Phytochemistry**, v. 21, n. 2, p. 329-337, 1982.
- 42- SIMÕES, C. M. O. MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P.; IRGANG, B.E. STEHMANN, J. R. **Plantas medicinais do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre, Ed. Da Universidade/ UFRGS, 1986.
- 43- HOUGHTON, P. J., & MANBY, J. Medicinal plants of the Mapuche. **J. Ethnopharmacol.** n. 13, p. 89-103, 1985.
- 44- TRINTA, E. F. & SANTOS, E. Winteráceas. **Flora Ilustrada Catarinense**, Itajaí, Ed. Herbário Barbosa Rodrigues, 1997.
- 45- CECHINEL FILHO, V., SCHLEMPER, V., SANTOS, A. R. S., PINHEIRO, T. R., YUNES, R. A., MENDES, G. L., CALIXTO, J. B. & DELLE MONACHE, F. Isolation and identification of active compounds from *Drimys winteri* barks. **J. Ethnopharmacol.**, n. 62, p. 223-27, 1998.
- 46- BROWN, G. D. Drimendiol, a sesquiterpene from *Drimys winteri*. **Phytochemistry**, v. 35 n. 4, p. 975-977, 1994.
- 47- SIERRA, J. R., LÓPEZ, J. T. & CORTÉS, M. J. (-)-3 $\beta$ -acetoxymenol from the leaves of *Drimys winteri*. **Phytochemistry**, v. 25, n. 1, p. 253-54, 1986.
- 48- CORTÉS, M. & OYARZÚN, M. L. Tadeonal and Isotadeonal from *Drimys winteri*. **Fitoterapia**, v. 52, n.1, p. 33-35, 1981.
- 49- APPEL, H.; DOHR, R. Terpenos Del Canelo Chileno. **Scientia**, n. 25, p. 135-42, 1958.
- 50- APPEL, H. H.; ROTMAN, B.; THORTON, F. Estudios sobre la estructura del drimenol. **Scientia**, n. 23, p. 19-21, 1956.
- 51- APPEL, H. H. Estudio químico de la corteza del arbol *Drimys winteri* forst. **Scientia**, n. 15, p. 31-32, 1948.
- 52- AASEN, A.; TOSHIKI, N.; ENZELL, C. R.; APPEL, H. H. The structure of 11 $\xi$ , 12 $\xi$ )-11,12-di(7-drimen-11-oxy)-11,12-epoxy-7-drimene. **Acta Chemica Scandinavica B**, n. 31, p. 51-55, 1977.
- 53- CRUZ, A. & SILVA, M. Further terpenoids and phenolics of *Drimys winteri*. **Phytochemistry**, n. 12, p. 2549-50, 1973.
- 54- APPEL, H. H.; BOND, R. P. M.; OVERTON, K. H. Sesquiterpenoids-III. The constitution and stereochemistry of valdiviolide, fuegin, winterin and futronolide. **Tetrahedron**, v. 19, p. 635-641, 1963.
- 55- REYES, A., REYES, M., ALVEAL, A. & GARCÍA, H. Compuestos fenolicos de *Drimys winteri* Forst variedad andina. **Rev. Latinoamer. Quím.** V. 2, n. 1, p. 42, 1990.

- 56- TORRES, R., PARDO, F. & VELASCO, M.V. Flavonoid from *Drimys winteri*. **Fitoterapia**, n. 6, p. 553-558, 1992.
- 57- VICHNEWKI, W.; KULANTHAIVEL, P.; HERZ, W. Drimane derivates from *Drymis brasiliensis*. **Phytochemistry**, v. 25, n. 6, p. 1476-1478, 1986.
- 58- FERRETO, L., CICCIO, J. F., CASTRO, V., & ANDRADE, R. Drimane derivates from *Drimys granadensis* L. F. (Winteraceae). **Spectroscopy Int. J.** n. 6, p. 133-136, 1988.
- 59- CICCIO, J. F. Polygodial, Constituyente Mayoritario de la Corteza de *Drimys granadensis* L.f. (Winteraceae). **Ingeniería y Ciencia Química**. V. 8, n. 3-4, p.45-46, 1984.
- 60- DIAS, A. M. P., DIAS, P. P. & BONILLA, J. Glicosidos Flavonoidicos de *drimys granadensis*. **Rev. Latinoamer. Quim.** v. 16, n. 1, p. 28-30, 1985.
- 61- APPEL, H. H.; BROOKS, C. J. W.; OVERTON, K. H. The constitution and stereochemistry of Drimenol, a novel bicyclic terpenoid. **J. Chem. Soc. P.** 3322-3332, 1959.
- 62- JANSEN, B. J. M., & GROOT, A. The occurrence and biological activity of drimane sesquiterpenoids. **Nat. Prod. Rep.**, v. 8, n. 3, p. 309-318, 1991.
- 63- JACOBSSON, U.; MUDDATHIR, A. K. Four biologically active sesquiterpenes of the drimane type isolated from *Polygonum glabrum*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 12, p. 4207-4211, 1992.
- 64- MASHIMBYE, M. J.; MAUMELA, M. C.; DREWES, S. E. A drimane sesquiterpenoid lactone from *Warburgia salutaris*. **Phytochemistry**, v. 51, p. 435-438, 1999.
- 65- BASTOS, J. K.; KAPLAN, M. A. C.; GOTTLIEB, O. R. Drimane-type sesquiterpenoids as chemosystematic markers of Canellaceae. **J. Bras. Chem. Soc.** V. 10, n. 2, p. 136-139, 1999.
- 66- UKADA, R. K.; SCHEUER, P. J. Sesquiterpenoid constituents of eight porostome nudibranchs. **J. Org. Chem.** V. 48, n. 1866-1869, 1983.
- 67- CIMINO, G.; SODANO, G.; SPINELLA, A. Occurrence of olepupane in two mediterranean nudibranchs: A protected form of polygodial. **J. Nat. Prod.** V. 51, n. 5, p. 1010-1011, 1988
- 68- HIROTANI, M.; FURUYA, T.; SHIRO, M. Cryptoporic acids H and I, drimane sesquiterpenes from *ganoderma neo-japonicum* and *cryptoporus volvatus*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 5, p. 1555-59, 1991.

- 69- AVILA, C.; CIMINO, G.; CRISPINO, A. SPINELLA, A. Drimane sesquiterpenoids in Mediterranean *Dendrodoris nudibranchs*: Anatomical distribuion and biological role. **Experientia** v. 47, p. 306-310, 1991.
- 70- AAKAWA, Y.; HASHIMOTO, T.; MIZUNO, Y.; TORI, M.; FUKAZAWA, Y. Cryptoporic acids A-G, drimane-tipe sesquiterpenoid ethers of isocratic acid from the fungus cryptoporus volvatus. **Phytochemistry**, v. 31, n. 2, p. 579-592, 1992.
- 71- MONTAGNAC, A.; MARTIN, M. T.; DEBITUS, C.; PAIS, M. Drimane sesquiterpenes from sponge *Dysidea fusca*. **J. Nat. Prod.**, n. 59, p. 866-868, 1996.
- 72- URBAN, S.; CAPON, R. J. Absolute stereochemistry of puupehenone and related metabolites. **J. Nat. Prod.** V. 59, p. 900-901, 1996.
- 73- AVILA, C.; CIMINO, G.; CRISPINO, A.; SPINELLA, A. Drimane sesquiterpenoids in Mediterranean *Dendrodoris nudibranchs*: Anatomical distribution and biological role. **Experientia**, n. 47, p. 306-10, 1991.
- 74- LEE, S. H., LEE, J. R., LUNDE, C. S. & KUBO, I. *In Vitro* Antifungal Susceptibilities of *candida albicans* and Other Fungal Pqthogens to Polygodial, a Sesquiterpene Dialdehyde. **Planta Med.** n. 65, p. 204-208, 1999.
- 75- JAIN, D. C. & TRIPATHI, A. K. Potential of Natural Products as Insect Antifeedants. **Phytotheraty Research**. N. 7, p. 327-334, 1993.
- 76- HIMEJIMA, M.; KUBO, I. Antimicrobial agents from *Licaria puchuri-major* and their synergistic effect with polygodial. **J. Nat. Prod.**, v. 55, n. 5, p. 620-625, 1992.
- 77- SAMUELSSON, G. Sesquiterpenoids and diterpenoids with pharmacological and biological activities. **Acta Pharmaceutica Fennica**, v. 101, p. 33-44, 1992.
- 78- KUBO, I.; HIMEJIMA, M. Potentiation of antifungal activity of sesquiterpenes dialdehydes against *Candida albicans* and two other fungi. **Experientia**, v. 48, p. 1162-1164, 1992.
- 79- ANKE, H. & STERNER, O. Comparison of the Antimicrobial and Cytotoxic Activities of Twenty Unsaturated Sesquiterpene Dialdehydes from Plants and Mushromms. **Planta Med.** n. 57, p. 344-346, 1991.
- 80- DUKE, S. O. Natural pesticides from plants.p 511-517 In: J. Janick and J. E. Simon (eds), **Advances in new crops**. Timber Press, Portland, OR, 1990.
- 81- KUBO, I.; TANIGUCHI, M. Polygodial , an antifungal potentiator. **J. Nat. Prod.**, v. 51, n. 1, p. 22-29, 1988.

- 82- CIMINO, G.; SODANO, G.; SPINELLA, A. Correlation of the reactivity of 1,4-dialdehydes with methylanine in biomimetic conditions to their hot taste: Covalent binding to primary amines as a molecular mechanism in hot taste receptors. **Tetrahedron**, v. 43, n. 22, p. 5401-5410, 1987.
- 83- CAPRIOLI, V.; CININO, G.; COLLE, R.; GAVAGNIN, M.; SODANO, G.; SPINELLA, A.; Insect antifeedant activity and hot taste for humans of selected natural and synthetic 1,4-dialdehydes. **J. Nat. Prod.**, v. 50, n. 2, p. 146-51, 1987
- 84- McCALLION, R. F., COLE, A. L. J., WALKER, J. R. L., BLUNT, J. W. & MUNRO, H. G. Antibiotic Substances from New Zeland Plants. **Planta Med.**, n. 44, p. 134-138, 1982.
- 85- BARNES, C. S.; LODER, J. W. Structure of polygodial – A new sesquiterpene dialdehyde from *Polygonum hidropiper* L. **Aust. J. Chem.**, v. 2, n. 15, p. 322, 1962.
- 86- TRATSK, K.S., CAMPOS, M.M., VAZ, Z.R., CECHINEL FILHO, V., SCHLEMPER, V., YUNES, R.A. & CALIXTO, J. Anti-allergic effects and oedema inhibition caused by the extract of *Drimys winteri*. **Inflamm. Res.** n. 46, p. 509-514, 1997.
- 87- EL SAYAH, M., CECHINEL FILHO, V., YUNES, R. A. & CALIXTO, J. B. Action of the extract of *Drimys winteri* on contraction induced by inflammatory mediators, compound 40/80 and ovalbumin of the guinea pig trachea in vitro. **Gen. Pharmacol.**, n. 28, p. 699-704, 1997.
- 88- MENDES, G. L., SANTOS, A. R. S., CAMPOS, M. M., TRATSK, K. S., YUNES, R. A., CECHINEL-FILHO, V., & CALIXTO, J. B. Anti-hiperalgesic properties of the extract and the main sesquiterpene polygodial isolated from the barks *Drimys winteri*. **Life Sciences**, v. 63, n. 5, p. 369-381, 1998.
- 89- EL SAYAH, M., CECHINEL FILHO, V., YUNES, R. A., PINHEIRO, T. R. & CALIXTO, J. B. Action of polygodial, a sesquiterpene isolated from *Drimys winteri* in the guinea pig ileum and trachea in vitro. **Eur. J. Pharmacol.**, n. 344, p. 215-221, 1998.
- 90- MENDES, G. L., SANTOS, A. R. S., MALHEIROS, A., CECHINEL FILHO, V., YUNES, R. A. & CALIXTO, J. B. Assessment of Mechanisms Involved in Antinociception Caused by sesquiterpene Polygodial. **J. Pharm. Exp. Ther.**, v. 292, n. 1, p. 164-172, 2000.
- 91- ANDRÉ, E., MALHEIROS A., CECHINEL FILHO, V., YUNES, R. A. & CALIXTO, J. B. Mechanisms underlying the endothelium-dependent and independent relaxation caused by the sesquiterpene polygodial in vessels from rabbit and guinea-pig *in vitro*. **Eur. J. Pharmacol.**, n 386, p. 47-53, 1999.

- 92- EL SAYAH, M., CECHINEL FILHO, V., YUNES, R. A., MALHEIROS, A. & CALIXTO, J. B. Action of polygodial on agonist induced contraction of the rat portal vein *in vitro*. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 35, n. 4, p. 670-75, 2000.
- 93- WENKERT, E.; STRIKE, D. P. Syntesis of some drimanic sesquiterpenes. **J. Amer. Chem. Soc.**, v. 86, p. 2044-2050, 1964.
- 94- VOGEL, A. I. **Vogel's Textbook of pratical org. Chem.** 5th ed. Longman Scientific & Technical, Longam Group UK.
- 95- CAMPAIGNE, E.; LeSUER, W. M. 3-Thenoic acid. **Organic Syntheses**, p. 919-920.
- 96- NISHIMURA, H.; NAKAMURA, T.; MIZUTANI, J. Allelopathic effects of p-menthane-3,8-diols in *Eucalyptus citriodora*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 12, p. 211-218, 1993.
- 97- BARNES, R. A.; SOEIRO O. M. The alkaloids of *Croton bonpladianum*. **Phytochemistry**, v.20, p.543-544, 1981.
- 98- PINHEIRO, T. R.; YUNES, R. A.; LÓPEZ, S. N.; SANTECCHIA, C. B.; ZACCHINO, S. A. S.; CECHINEL FILHO, V. In vitro Antifungal Evaluation ans Studies on the Mode of Action of Xanthoxyline Derivatives. **Arzneim-Forsch/Drug Res.**, n. 49, p. 1039-1043, 1999
- 99- VAZ, Z. R., CECHINEL FILHO, V., YUNES, R.A., & CALIXTO, J. B. Antinociceptive action of 2-(4-bromobenzoyl)-3-methyl-4,6-dimethoxy benzofuran, a novel xanthoxyline derivative on chemical and thermal models of nociception in mice. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** n. 278, p. 304-312, 1996.
- 100- HUNSKAAR, S., FASMAR, O. B., & HOLE, K. Formalin test in mice: a useful technique for evaluating mild analgesics. **J. Neurosci. Methods**, n. 14, p. 69-76, 1985.
- 101- LUNDE, C. S.; KUBO, I. Effect of polygodial on the mitochondrial ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. **Antimicrob Agents CH**, n. 7, p. 1943-1953, 2000.
- 102- MASSCHENDORP, L.; GOLS, G. J. Z.; VAN LOON, J. J. A. Behavioural observations of *Piers brassicae* larvae indicate multiple mechanisms of action of analogous drimane antifeedants. **Entomol. Exp. Appl.**, n. 3, p. 217-227, 2000.
- 103- MALHEIROS, A., CECHINEL FILHO, V., SCHMITT, C. B., SANTOS, A. R. S., SCHEIDT, C.; CALIXTO, J. B., DELLE MONACHE, F. & YUNES, R. A. A sesquiterpene drimane with antinociceptive activity from *Drimys winteri* bark. **Phytochemistry**, in press.

- 104 – NAKANO, T.; VILLAMIZAR, J. E.; MAILLO, M. A. Highly Efficient Síntesis of Optically Active Drimanic Sesquiterpenes, (+)-Fuegim, (+)-Epifutronolide (7 $\beta$ -Hidroxyisodrimenin) and (+)-7-Ketoisodrimenin. **Tetrahedron**, v. 55, p. 1561-1568, 1999.
- 105 - BLUMENTHAL, E. E. A.; DA SILVA, S.; YOSHIDA, M. Lignoids and poliketides of *Virola surinamensis*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 4, p. 745-49, 1997.
- 106 – KOUL, S. K.; TANEJA, S. C.; DHAR, K. L.; ATAL, C. K. Lignans of *Piper clusii*. **Phytochemistry**, v. 22, n. 4, p. 999-1000, 1983.
- 107- NASCIMENTO, I. R.; LOPES, L. M.X., 2,3-Dihydrobenzenofuran neolignans from *Aristolochia pubescens*. **Phytochemistry**, v. 52, n. 2, p. 345-350, 1999.
- 108- SUQUEIRA, J. B. G.; ZOGHBI, M. D. B.; CABRAL, J. A. et al. Lignans from *Protium tenuifolium*. **J. Nat. Products**, v. 58, n. 5, p. 730-732, 1995.
- 109- JONASSOHN, M.; DAVIDSSON, R.; KAHNBERG, P. STERNER, O. The reactivity of drimane unsaturated dialdehydes towards nucleophiles. **Tetrahedron**, v. 53, n.1, p. 237-244, 1997.
- 110 – MARINI-BETTOLÓ, G. B.; NICOLETTI, M.; PATAMIA, M.; GALEFFI, M.; MESSANA, I. Plant Screenig by Chemical and Chromatographic Procedures under Fild Conditions. **J. Chromatogr.** N. 213, p. 113-127, 1981.